

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2004年 3月29日

出願番号
Application Number: 特願2004-097047

パリ条約による外国への出願に用いる優先権の主張の基礎となる出願の国コードと出願番号

The country code and number of your priority application, to be used for filing abroad under the Paris Convention, is

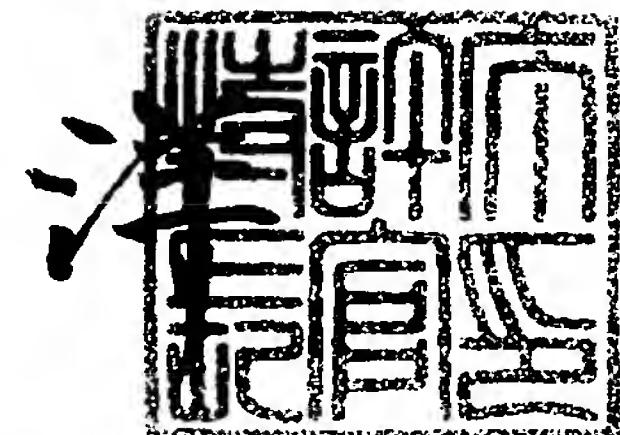
J P 2004-097047

出願人
Applicant(s): 中村 敏一
クリングルファーマ株式会社

2005年 4月27日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



【首欄印】

付印願

【整理番号】

K12J1336

【提出日】

平成16年 3月 29日

【あて先】

特許庁長官殿

【国際特許分類】

C12N 15/09

A61K 38/00

C12P 21/02

C07K 14/475

【発明者】

【住所又は居所】

京都府京都市左京区岡崎法勝寺町1番地の4

【氏名】

中村 敏一

【発明者】

【住所又は居所】

大阪府箕面市小野原東6-25-2-2-204号

【氏名】

松本 邦夫

【発明者】

【住所又は居所】

大阪府箕面市小野原東5-18-27 Tメゾンロベリア 20
2号

【氏名】

福田 一弘

【特許出願人】

【識別番号】

591115073

【氏名又は名称】

中村 敏一

【特許出願人】

【識別番号】

502068908

【氏名又は名称】

クリングルファーマ株式会社

【代理人】

【識別番号】

100077012

【弁理士】

【氏名又は名称】

岩谷 龍

【手数料の表示】

【予納台帳番号】

066372

【納付金額】

21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 特許請求の範囲 1

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0204590

【包括委任状番号】 0313802

【請求項 1】

ウロン酸残基とグルコサミン残基からなる2糖の繰り返し構造のヘパリン様骨格を有する2乃至16糖のオリゴ糖であって、

ウロン酸残基及びグルコサミン残基の少なくとも1つのヒドロキシル基が硫酸化、アルキル化、アシリ化又はアミノ化されていてもよく、グルコサミン残基の2位のアミノ基が硫酸化、アルキル化又はアシリ化されていてもよいオリゴ糖又はその塩を有効成分として含有するHGF産生促進薬剤。

【請求項 2】

ウロン酸残基の2位並びにグルコサミン残基の3位及び6位のヒドロキシル基が硫酸化されていてもよく、グルコサミン残基の2位のアミノ基が硫酸化又はアセチルでアシリ化されていてもよい請求項1記載のHGF産生促進薬剤。

【請求項 3】

ウロン酸がイズロン酸又はグルクロン酸である請求項1又は2記載のHGF産生促進薬剤。

【請求項 4】

2乃至8糖からなるヘパリン様骨格を有するオリゴ糖である請求項1～3のいずれかに記載のHGF産生促進薬剤。

【請求項 5】

オリゴ糖が、高分子ヘパリン又は高分子ヘバラン硫酸のヘパリナーゼ又はヘパリチナーゼ分解物であることを特徴とする請求項2～4記載のHGF産生促進薬剤。

【請求項 6】

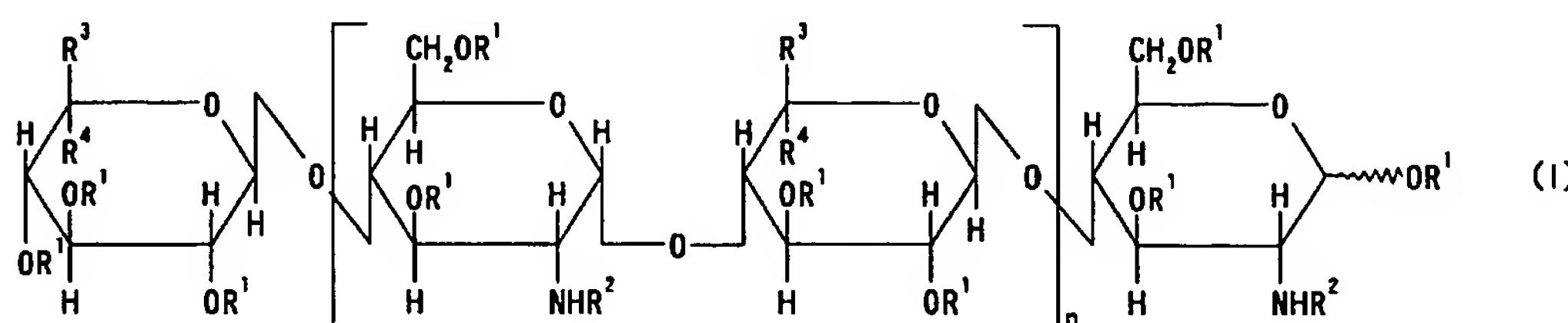
オリゴ糖が、高分子ヘパリン又は高分子ヘバラン硫酸の亜硝酸分解法、過酸化水素分解法又は β 脱離のいずれかによる分解物であることを特徴とする請求項2～4記載のHGF産生促進薬剤。

【請求項 7】

オリゴ糖が、次の(a)～(h)で表される化合物のいずれかである請求項1記載のHGF産生促進薬剤：

(a) 式(I)

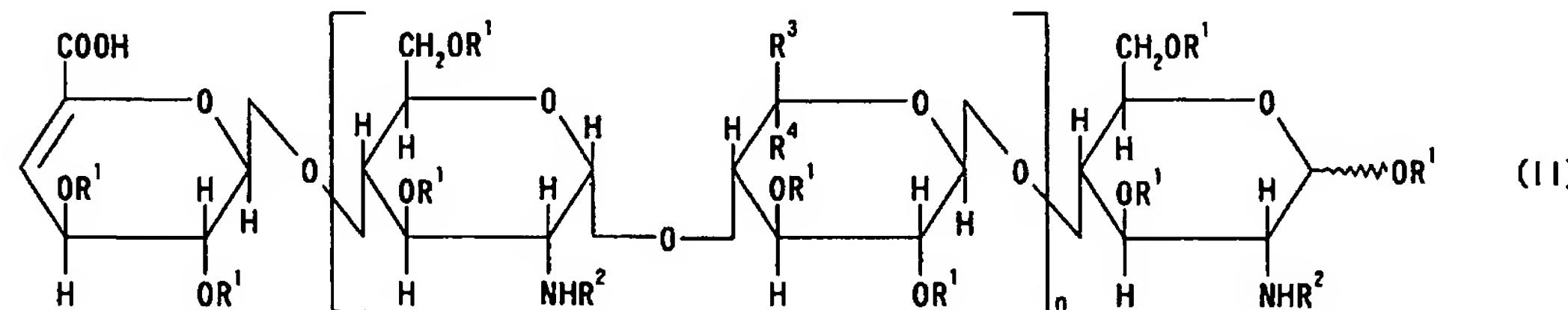
【化1】



(式中、R¹は、水素、硫酸基、アルキル、アシリル又は置換基を有していてもよいアミノを示し、R²は、水素、硫酸基、アルキル又はアシリルを示し、R³及びR⁴は異なって、水素又はカルボキシルを示し、nは0～7を示す。)

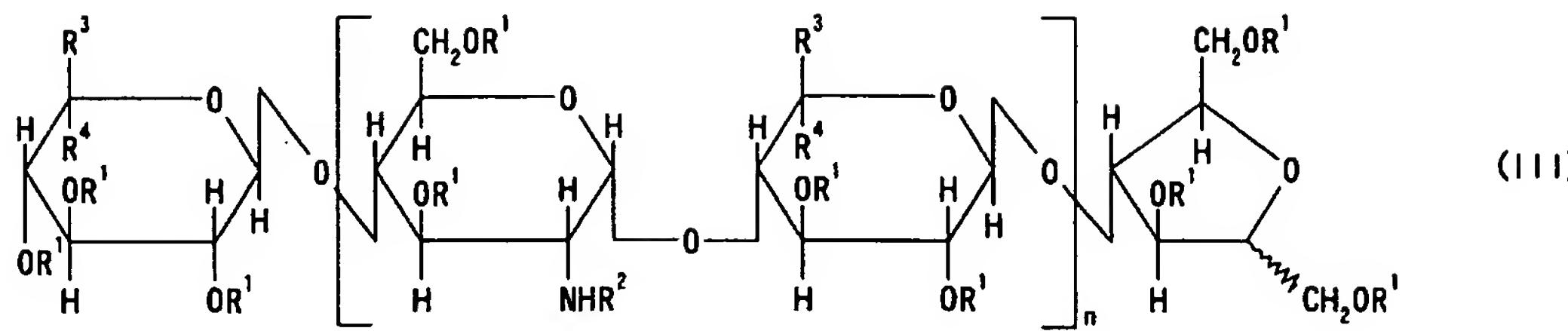
(b) 式(II)

【化2】



(式中、各記号は上記と同じである。)

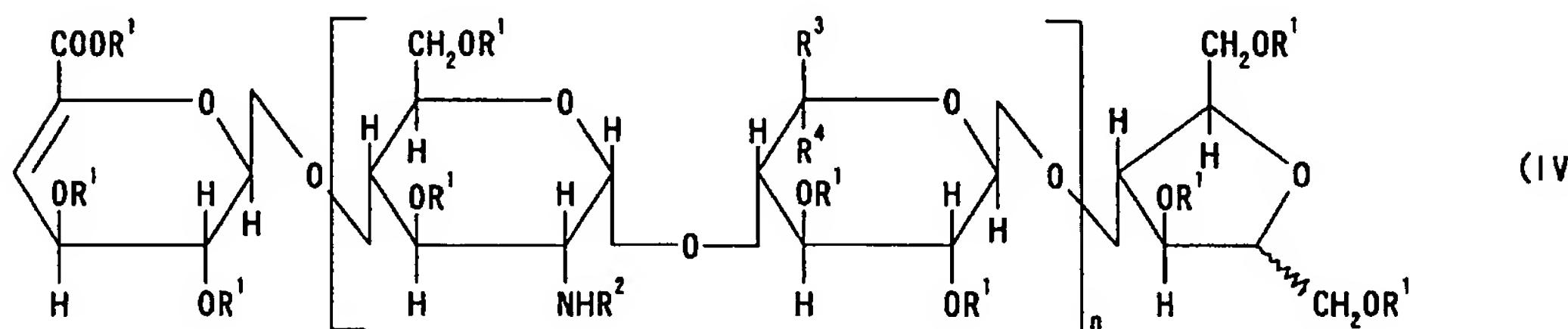
【化3】



(式中、各記号は上記と同じである。)

(d) 式 (IV)

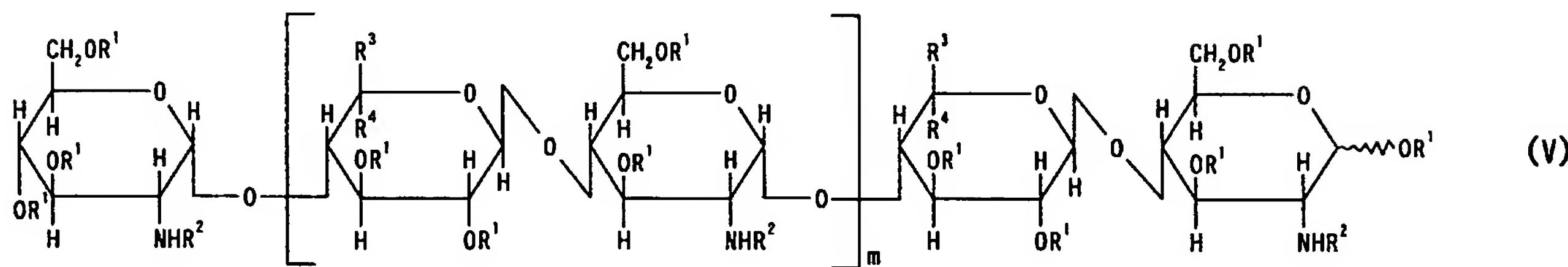
【化4】



(式中、各記号は上記と同じである。)

(e) 式 (V)

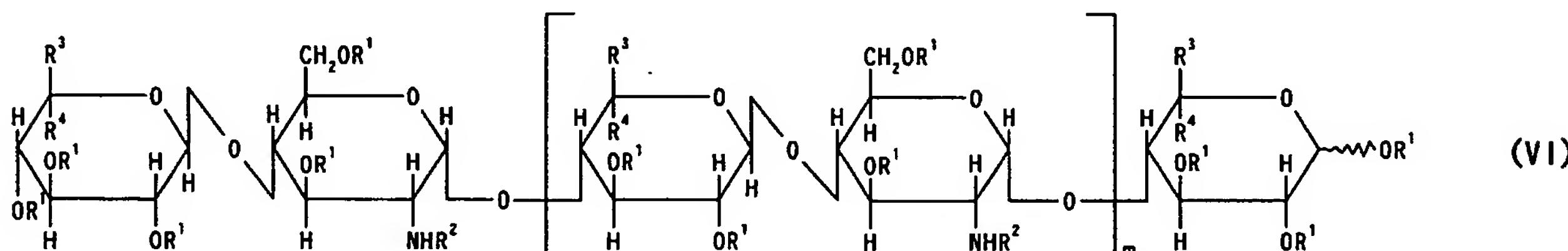
【化5】



(式中、mは0～6を示し、R¹、R²、R³及びR⁴は上記と同じである。)

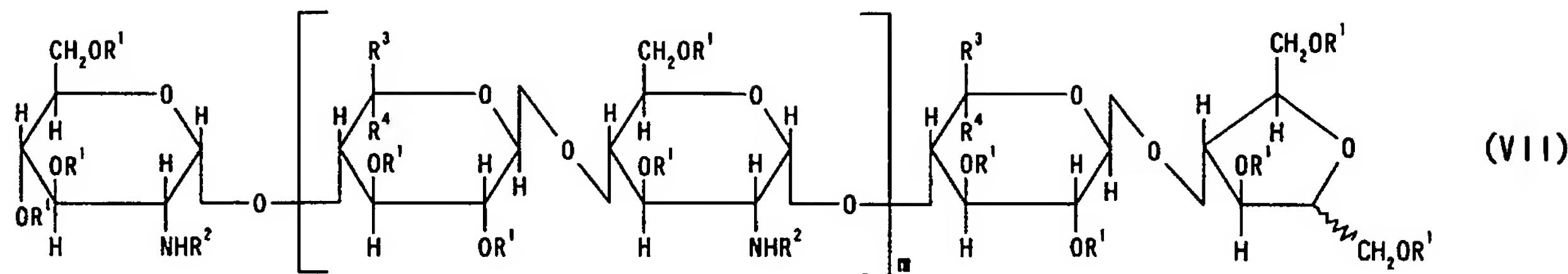
(f) 式 (VI)

【化6】



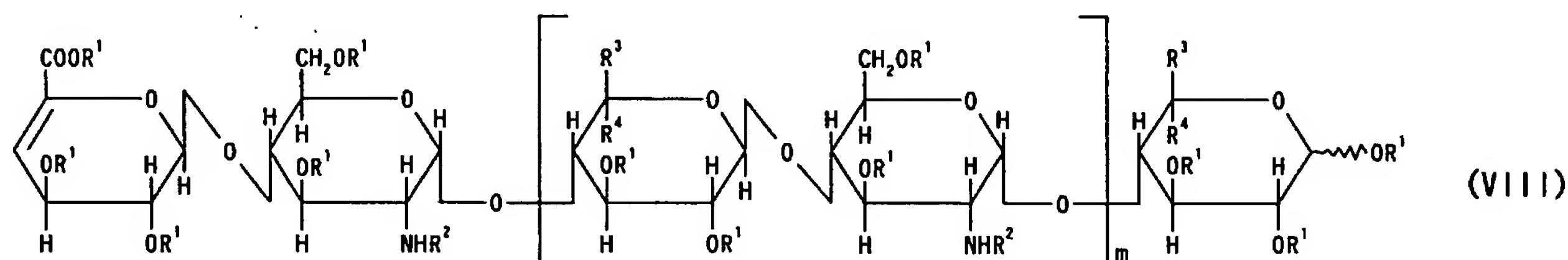
(式中、mは0～6を示し、R¹、R²、R³及びR⁴は上記と同じである。)

(g) 式 (VII)



(式中、mは0～6を示し、R¹、R²、R³及びR⁴は上記と同じである。)、又は
(h) 式 (VIII)

【化8】



(式中、mは0～6を示し、R¹、R²、R³及びR⁴は上記と同じである。)

【請求項8】

オリゴ糖又はその塩が、抗血液凝固作用及びリボプロテインリバーゼ放出作用を有さないか、それらの作用が抑制されていることを特徴とする請求項1～7のいずれかに記載のHGF産生促進薬剤。

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヘパリン様骨格を有する低分子オリゴ糖又はその塩を含有するHGF産生促進薬剤に関する。

【背景技術】

【0002】

再生因子・治療因子としてHGF（肝細胞増殖因子）が注目を浴びている。HGFは肝実質細胞の増殖を指標として発見された蛋白質であるが、その後の研究により、HGFは肝実質細胞以外にも多くの上皮系細胞や一部の間葉系細胞にも増殖作用を示すことが明らかとなっている。また、HGFの示す活性は細胞増殖活性のみならず、細胞遊走促進、形態形成促進、細胞死抑制、血管新生作用等多様な活性を示すことも知られている（非特許文献1）。HGFはその薬理作用から肝硬変治療剤、腎疾患治療剤、上皮細胞増殖促進剤、抗ガン剤、ガン療法用副作用防止剤、肺障害治療剤、胃・十二指腸損傷治療剤、脳神経障害治療剤、免疫抑制副作用防止剤、コラーゲン分解促進剤、軟骨障害治療剤、動脈疾患治療剤、肺線維症治療剤、肝臓疾患治療剤、血液凝固異常治療剤、血漿低蛋白治療剤、創傷治療剤、神経障害改善薬、造血幹細胞増加剤、育毛促進剤等（特許文献1～14参照）としての開発が期待されている。

【0003】

HGFは主に間葉系の細胞によって産生されるが、その産生量は臓器の傷害に応じて上昇する。例えば、肝臓に傷害が起こると、肝臓の血管内皮細胞やクッパー細胞、伊東細胞等の肝非実質細胞でHGFの産生が高まる。一方、この時、無傷の肺、脾臓、腎臓等の他の臓器でもHGFの発現が上昇し、血中のHGFレベルが上昇する。このことは、臓器の傷害に応じてHGFの発現を誘導する因子が血中に存在することを示すが、そのような因子はインジュリンと総称される（非特許文献2）。

インジュリンは単一の物質ではなく、例えばインターロイキン-1、FGF（線維芽細胞増殖因子）、PDGF（血小板由来増殖因子）等のサイトカインに加え、プロスタグランジン等のオータコイドがインジュリンとして同定されている。これらの因子は、HGFのmRNAの発現を上昇させることにより、HGFの産生を高める。一方、インジュリンの探索過程でヘパリン及びヘパラン硫酸にもHGF産生促進活性があることが見出された（非特許文献3）。

ヘパリン及びヘパラン硫酸はHGFのmRNAの発現を上昇させずに、翻訳過程以後のステップに作用することが示唆されているが、詳細な機構は不明である。

【0004】

ヘパリン及びヘパラン硫酸は、グリコサミノグリカン（GAG）として知られる一群の多糖類のメンバーである。ヘパリン及びヘパラン硫酸は、D-グルコサミンとウロン酸からなる二糖を基本単位とし、該二糖の繰り返しによって構成される多糖である（非特許文献4）。

ヘパリン及びヘパラン硫酸の分子量は不均一で、5000から30000程度のものが混在している。D-グルコサミン残基の6位の炭素は部分的にO-硫酸化を受けており、また、アミノ基は部分的にN-アセチル化もしくはN-硫酸化を受けている。ウロン酸残基としてはL-イズロニ酸又はD-グルクロン酸の2種類をとりうるが、ヘパリンではほとんどがL-イズロニ酸であり、ヘパラン硫酸ではほとんどがD-グルクロン酸である。ウロン酸残基の2位の炭素は部分的にO-硫酸化を受けている。さらに、その他の部位でも硫酸化が起こる場合があり、これらの硫酸化の位置の多様性が分子に多様性を与えていく。ヘパリンの方がヘパラン硫酸よりも全体的に高度に硫酸化を受けている。しかしながら、組織から分離されるヘパリン又はヘパラン硫酸の調製物は不均一であり、両者の明確な区別は困難である。

【0005】

ヘパリンは、從来より主に抗血栓薬として臨床的に用いられている。例えは、ヘパリンは血液体外循環時の凝固防止や、播種性血管内凝固症候群（D I C）、心筋梗塞をはじめとする血栓性疾患の治療・予防等に用いられている。ヘパリンはそれ自体に抗血液凝固作用はないが、アンチトロンビンIII（A T I I I）やヘパリンコファクターIIと結合し、血液凝固因子である各種のセリンプロテアーゼを不活性化することで強力な血液凝固阻害作用を示す（非特許文献5）。

このように既に医薬品として使用されているヘパリンの新たな用途として、H G F 產生促進薬としての利用が考えられる（特許文献15）。

ヘパリンをH G F 產生促進薬として用いることができれば、前述のH G F の薬理作用を介した各種疾患の治療効果を向上させることができると期待できる。しかしながら、H G F の產生を促進する目的でヘパリンを用いる上では、従来から利用してきたヘパリンの抗血液凝固作用は出血傾向につながり、副作用となることが考えられる。ヘパリンを人体に投与する際は、投与中の出血を防止するために、抗血液凝固作用をモニターしながら投与量を慎重にコントロールしなければならない。特に、未分画の高分子ヘパリンは抗血液凝固作用が強く、使用に当たっては細心の注意が必要である。このように、ヘパリンの抗血液凝固作用は、H G F 產生促進薬として用いる際には欠点となる。

【0006】

また、ヘパリンは血管壁に存在するリボプロティンリバーゼ（L P L）を遊離させることによって血漿中のL P L活性を上昇させる作用も有している（非特許文献6）。

L P L活性の上昇は脂肪の分解によって血液清澄化を促すが、持続的なL P L活性の上昇は血中の遊離脂肪酸レベルを上昇させ、不整脈を引き起こす恐れがある。

そこで、抗血液凝固作用及びL P L放出活性は有しておらず、H G F 產生促進作用のみを有するヘパリン又はヘパラン硫酸を調製する方法が切望された。

【0007】

ヘパリンの抗血液凝固作用を低下させる方法として、ヘパリンを低分子化することが知られている（非特許文献7）。前述のように、未分画の高分子ヘパリンは抗血液凝固作用が強く、使用に当たっては細心の注意が必要である。このような高分子ヘパリンの欠点を克服するものとして低分子ヘパリンが利用されている。前述のごとく、ヘパリンの抗血液凝固作用はヘパリン-AT III複合体の形成によるものである。ヘパリン-AT III複合体はトロンビン（血液凝固因子IIa）やその他の凝固因子（Xa、XIIa、XIa、IXa等）に結合してそれらを不活性化する。IIaの抑制には18糖以上のヘパリン構造が必要であり、高分子ヘパリンでは特にIIaとXaの不活性化が主な作用である。一方、ヘパリンを16糖以下のサイズに低分子化すると、18糖以上で見られるIIa阻害活性が抑制されるため、抗血液凝固活性が低下することが知られている（非特許文献8、9）。

また、低分子ヘパリンではL P L放出活性も低下することが知られている。（非特許文献10）。

【0008】

このように、ヘパリンを低分子化することで抗血液凝固作用とL P L放出活性を低下させることが可能であるが、ここで、ヘパリンを低分子化させた場合に、H G F 產生促進活性が保持されるかが問題となる。低分子ヘパリンとして知られるダルテパリンナトリウム（フラグミン静注；キッセイ薬品工業株式会社）にはH G F 產生促進活性があることが知られている（非特許文献11）。

しかし、ダルテパリンナトリウムは平均分子量では5000であるものの、分子量の分布幅は2000～9000と広く、このうちどの分子サイズがH G F 產生促進活性を担っているのか不明である。特に、16糖以下の分子サイズ（分子量5000以下）にH G F 產生促進活性が保持されているのかが重要であるが、この点は全く不明であった。

【特許文献1】特開平4-18028号公報

【特許文献2】特開平4-49246号公報

【特許文献3】ヨーロッパ公開第492614号公報

【付記文献】付添ドリーム・ジャーナル公報

- 【特許文献5】国際公開第3/8821号パンフレット
- 【特許文献6】特開平6-172207号公報
- 【特許文献7】特開平7-89869号公報
- 【特許文献8】特開平6-40934号公報
- 【特許文献9】国際公開第94/2165号パンフレット
- 【特許文献10】特開平6-40935号公報
- 【特許文献11】特開平6-56692号公報
- 【特許文献12】特開平7-41429号公報
- 【特許文献13】国際公開第93/3061号パンフレット
- 【特許文献14】特開平5-213721号公報
- 【特許文献15】特開平6-312941号公報
- 【非特許文献1】マツモト・ケー (Matsumoto, K) 他1名、キドニー・インターナショナル (Kidney Int.)、2001年、第59巻、p. 2023-2038
- 【非特許文献2】マツモト・ケー (Matsumoto, K) ら、プロシードィングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステート・オブ・アメリカ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA.)、1992年、第89巻、p. 3800-3804
- 【非特許文献3】マツモト・ケー (Matsumoto, K) ら、ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.)、1993年、第114巻、p. 820-826
- 【非特許文献4】スガハラ・ケー (Sugahara K) 他1名、アイ・ユー・ピー・エム・ビー・ライフ (IUBMB Life)、2002年、第54巻、p. 163-175
- 【非特許文献5】ボーリン・エム・シー (Bourlin, M. C) 他1名、ザ・バイオケミカル・ジャーナル (Biochem J.)、1993年、第289巻 (Pt 2)、p. 313-330
- 【非特許文献6】オリベクロナ・ティー (Olivecrona, T.) ら、ハーモステイシス (Haemostasis)、1993年、23巻 (Suppl. 1)、p. 150-160
- 【非特許文献7】リンハート・アール・ジェイ (Linhardt, R. J.) 他1名、セミナーズ・イン・トロンボシス・ヘモスタシス (Semin. Thromb. Hemost.)、1999年、第25巻、Suppl. 3、p. 5-16
- 【非特許文献8】ホルマー・イー (Holmer, E.) ら、ハーモステイシス (Haemostasis)、1986年、第16巻、suppl. 2、p. 1-7
- 【非特許文献9】レイン・ディー・エー (Lane D. A.) ら、ザ・バイオケミカル・ジャーナル (Biochem. J.)、1984年、第218、巻、p. 725-732
- 【非特許文献10】ナストロン・ビー (Nassstrom, B.) ら、ザ・ジャーナル・オブ・ラボラトリ・アンド・クリニカル・メディシン (J. Lab. Clin. Med.)、2003年、第142巻、p. 90-99
- 【非特許文献11】(Matsumoto, K.) ら、ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.)、1993年、第114巻、p. 820-826

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の課題は、ヘパリン様骨格を有し、ヘパリン又はヘパラン硫酸の抗血液凝固作用及びLPL放出活性を有さないか抑制されているオリゴ糖又はその塩を含むHGF産生促

・些末句を除いては、この段落は記載されていません。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは上記課題を解決すべくヘパリン及びヘパラン硫酸のHGF産生促進機能に関する研究を鋭意重ねた。その結果、ヘパリン又はヘパラン硫酸を低分子化したウロン酸残基とグルコサミン残基からなる2糖の繰り返し構造をもつヘパリン様骨格を有する2～16糖のオリゴ糖が、HGF産生促進作用を有することを見出した。また、前記オリゴ糖は、抗血液凝固作用及びリボプロテイン放出活性が低下していることを見出した。ヘパリン又はヘパラン硫酸を16糖以下に低分子化しても、HGF産生促進活性が保持されていることは従来全く知られていなかった。かかる知見に基づき本発明者らはさらに研究をすすめ、本発明の完成に至った。

すなわち本発明は、

(1) ウロン酸残基とグルコサミン残基からなる2糖の繰り返し構造のヘパリン様骨格を有する2乃至16糖のオリゴ糖であって、

ウロン酸残基及びグルコサミン残基の少なくとも1つのヒドロキシル基が硫酸化、アルキル化、アシル化又はアミノ化されていてもよく、グルコサミン残基の2位のアミノ基が硫酸化、アルキル化又はアシル化されていてもよいオリゴ糖又はその塩を有効成分として含有するHGF産生促進薬剤、

(2) ウロン酸残基の2位並びにグルコサミン残基の3位及び6位のヒドロキシル基が硫酸化されていてもよく、グルコサミン残基の2位のアミノ基が硫酸化又はアセチルでアシル化されていてもよい上記(1)記載のHGF産生促進薬剤。

(3) ウロン酸がイズロン酸又はグルクロン酸である上記(1)又は(2)記載のHGF産生促進薬剤、

(4) 2乃至8糖からなるヘパリン様骨格を有するオリゴ糖である上記(1)～(3)のいずれかに記載のHGF産生促進薬剤、

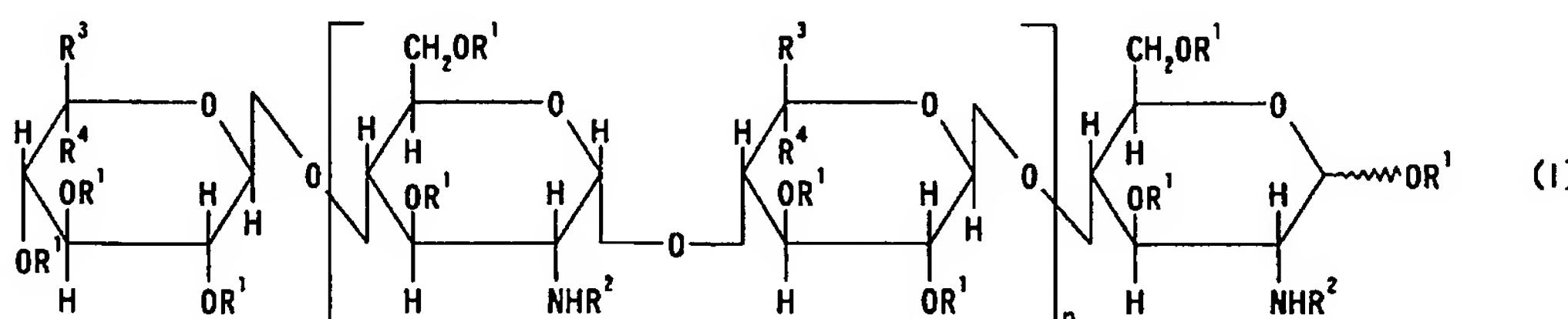
(5) オリゴ糖が、高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸のヘパリナーゼ又はヘパリチナーゼ分解物であることを特徴とする上記(2)～(4)記載のHGF産生促進薬剤、

(6) オリゴ糖が、高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸の亜硝酸分解法、過酸化水素分解法又はβ脱離のいずれかによる分解物であることを特徴とする上記(2)～(4)記載のHGF産生促進薬剤、

(7) オリゴ糖が、次の(a)～(h)で表される化合物のいずれかである上記(1)記載のHGF産生促進薬剤：

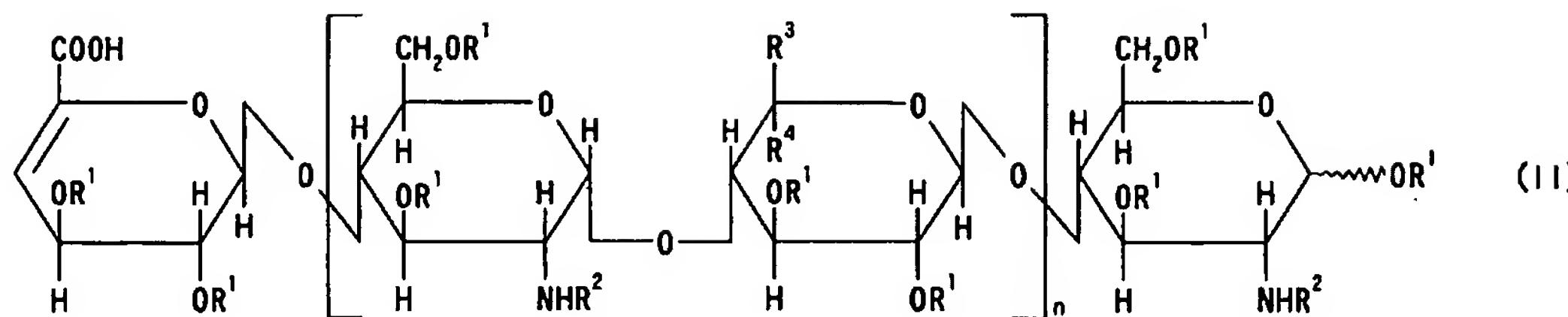
(a) 式(I)

【化1】



(式中、R¹は、水素、硫酸基、アルキル、アシル又は置換基を有していてもよいアミノを示し、R²は、水素、硫酸基、アルキル又はアシルを示し、R³及びR⁴は異なって、水素又はカルボキシルを示し、nは0～7を示す。)

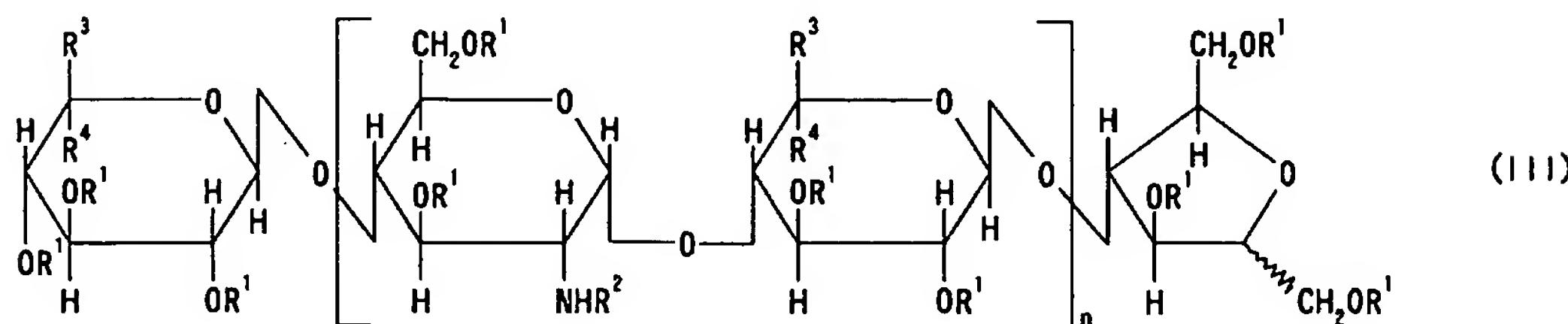
(b) 式(II)



(式中、各記号は上記と同じである。)

(c) 式 (III)

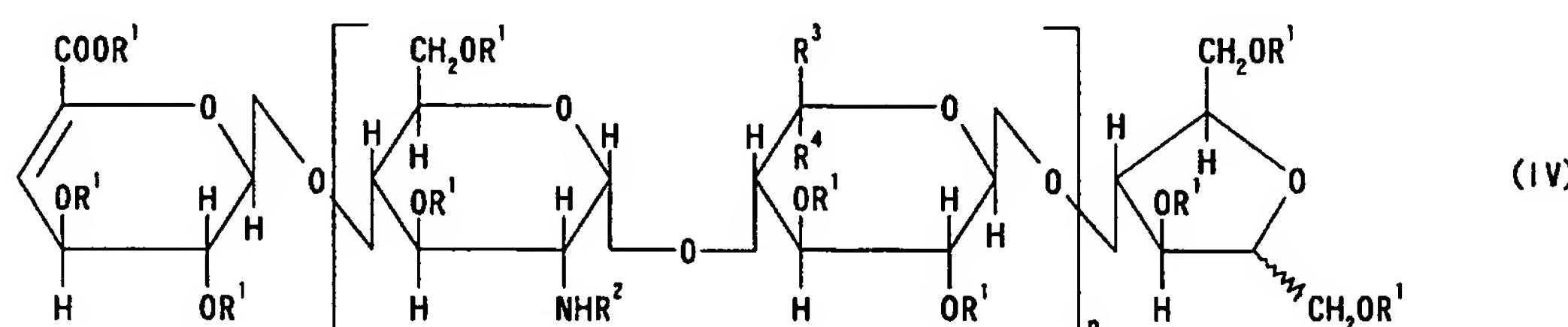
【化3】



(式中、各記号は上記と同じである。)

(d) 式 (IV)

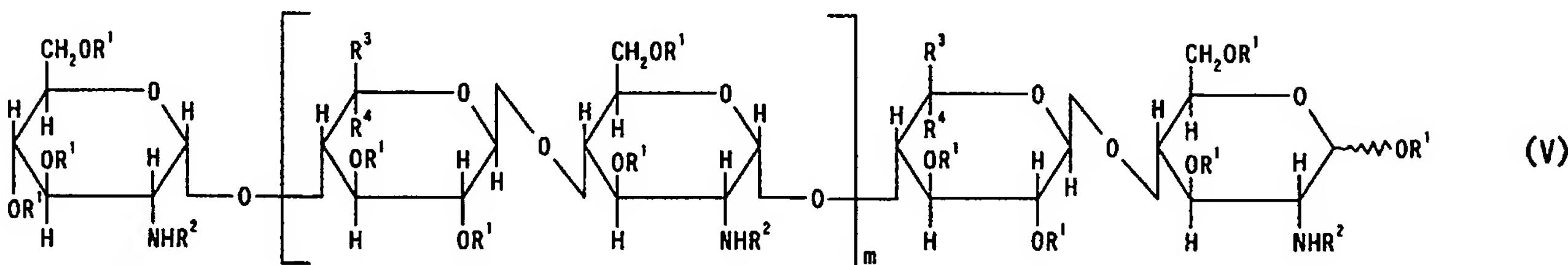
【化4】



(式中、各記号は上記と同じである。)

(e) 式 (V)

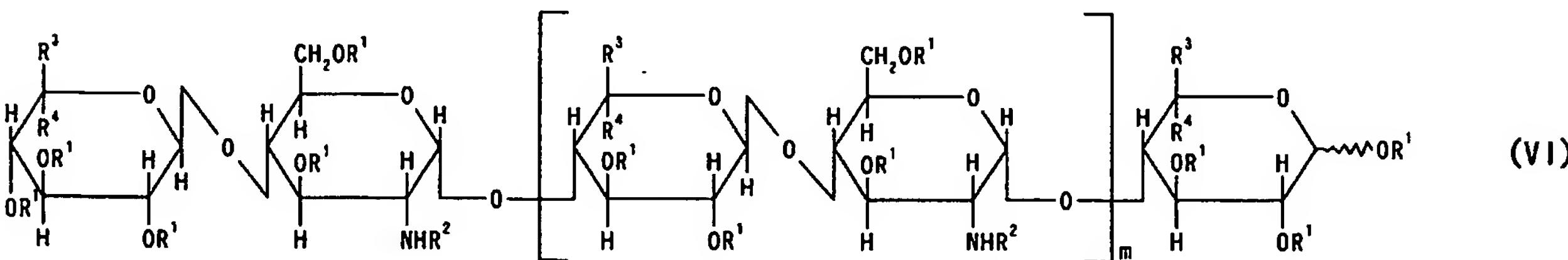
【化5】



(式中、mは0～6を示し、R¹、R²、R³及びR⁴は上記と同じである。)

(f) 式 (VI)

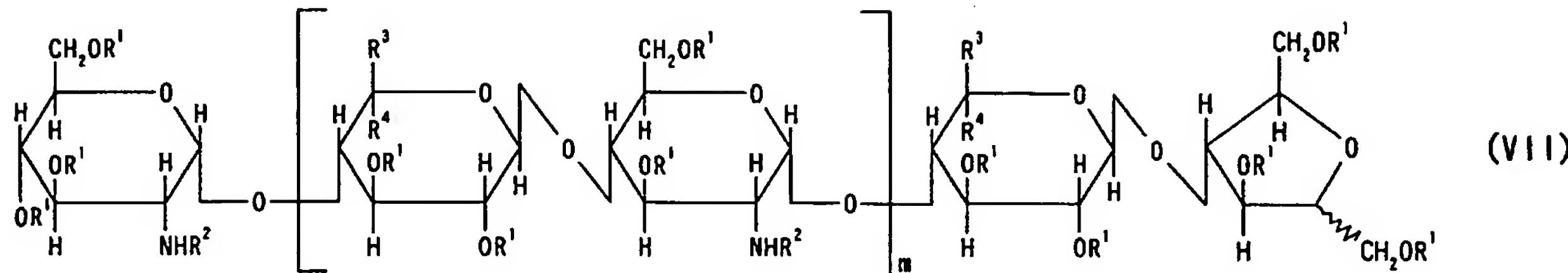
【化6】



(イ) オリゴ糖又はその塩が、抗血液凝固作用及びリボプロテインリバーゼ放出作用を有さないか、それらの作用が抑制されていることを特徴とする上記(1)～(7)のいずれかに記載のHGF産生促進薬剤、

(g) 式(VIII)

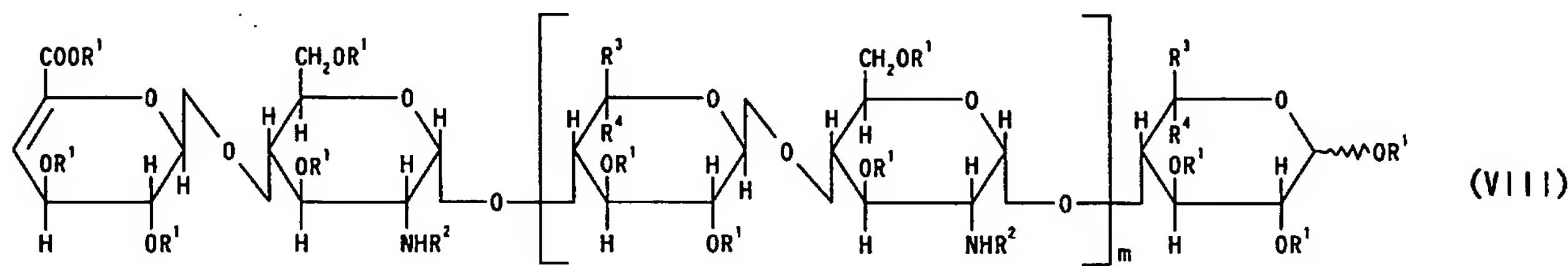
【化7】



(式中、mは0～6を示し、R¹、R²、R³及びR⁴は上記と同じである。)、又は

(h) 式(VIII)

【化8】



(式中、mは0～6を示し、R¹、R²、R³及びR⁴は上記と同じである。)、及び

(8) オリゴ糖又はその塩が、抗血液凝固作用及びリボプロテインリバーゼ放出作用を有さないか、それらの作用が抑制されていることを特徴とする上記(1)～(7)のいずれかに記載のHGF産生促進薬剤、

に関する。

【発明の効果】

【0011】

本発明のHGF産生促進薬剤に使用されるオリゴ糖は、ウロン酸残基とグルコサミン残基からなる2糖の繰り返しのヘパリン様骨格を有するにもかかわらず、出血傾向の副作用を有さないか、抑制しながらHGFの産生を促進することができ、生体の組織、器官等の傷害の治癒を促進することができる等の効果、より具体的には、肝疾患、腎疾患、皮膚疾患、血液疾患、眼疾患、肺疾患、胃十二指腸疾患、癌及びその関連疾患、骨疾患、中枢疾患等の治療に有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

本発明においてヘパリン様骨格とは、ウロン酸残基とグルコサミン残基が1,4グリコシド結合した二糖の基本単位が α 1,4グリコシド結合又は β 1,4グリコシド結合の繰り返し構造をもつ骨格をいう。また、オリゴ糖というときは、ウロン酸とグルコサミンの異なる二糖から構成されるヘテロオリゴ糖をいう。また、本発明においてアルキル化とは、ウロン酸残基のヒドロキシル基又は $/$ 及びグルコサミン残基のヒドロキシル基又は $/$ 及びアミノ基の水素がアルキル、好ましくは低級アルキルで置換されることをいう。

アシリル化とは、ウロン酸残基のヒドロキシル基又は $/$ 及びグルコサミン残基のヒドロキシル基又は $/$ 及びアミノ基の水素が、式 $-(C=O)-R^5$ 、 $-(C=O)-OR^5$ 、 $-(C=O)-NR^5R^6$ 、 $-(C=S)-NHR^5$ 、 $-SO-R^5$ 、 $-SO_2-R^5$ 又は $-SO_2-NHR^5$ （式中、R⁵及びR⁶は水素原子又は炭化水素基を示す。）で表されるアシリル基に置換されることをいう。前記式中、R⁵及びR⁶で示される炭化水素基としては、例えは、鎖状炭化水素基（例、アルキル、アルケニル、アルキニル等）などが挙げられる。アルキルとしては低級アルキルが好ましい。アルケニルとしては、例えはC₂～6アルケニル（例、ビニル、アリル、イソプロペニル、1-ブテニル、2-ブテニル、3-ブテニル、2-メチル-2-ブロペニル、1-メチル-2-ブロペニル、2-メチル-

1-ノロハール等によく好ましい。ノルハールとしては、例へばシ-2-6ノルハール（例、エチニル、プロパルギル、1-ブチニル、2-ブチニル、3-ブチニル、1-ヘキシニル等）などが好ましい。

アミノ化とは、ウロン酸残基のヒドロキシル基又は/及びグルコサミン残基のヒドロキシル基の水素が、アミノ基に置換されることをいう。該アミノ基は更に硫酸基、アルキル、アシルで置換されていてもよい。

なお、本発明において低級アルキルとは、炭素数1～6のアルキル、例えはメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ベンチル、ヘキシル等をいう。

【0013】

本発明のHGF産生促進薬剤に使用されるオリゴ糖を構成するウロン酸残基は、2位及び3位のヒドロキシル基のうち少なくとも1つのヒドロキシル基が硫酸化、アルキル化、アシル化又はアミノ化されていてもよいが、硫酸化がより好ましく、とりわけ2位のヒドロキシル基の硫酸化が好ましい。前記硫酸化の程度は特に制限はないが、好ましくはより高度に硫酸化されている方がよい。また、ウロン酸残基は、L-イズロン酸残基（以下、IdoAと略記する。）及びD-グルクロン酸残基（以下、GlcAと略記する。）のいずれであってもよい。また、IdoA又はGlcAのみで存在してもよく、あるいはIdoAとGlcAが混在していてもよく、IdoAとGlcAの存在比は特に制限はない。

【0014】

本発明のHGF産生促進薬剤に使用されるオリゴ糖を構成するグルコサミン残基は、2位のアミノ基が硫酸化、アルキル化又はアシル化されていてもよいが、硫酸化又はアシル化が好ましい。アシル化は、-(C=O)-R⁵でアシル化されていることがより好ましく、とりわけアセチルでアシル化されていることがより好ましい。また、該グルコサミン残基の3位及び6位のヒドロキシル基のうち少なくとも1つのヒドロキシル基が硫酸化、アルキル化、アシル化又はアミノ化されていてもよいが、硫酸化がより好ましい。

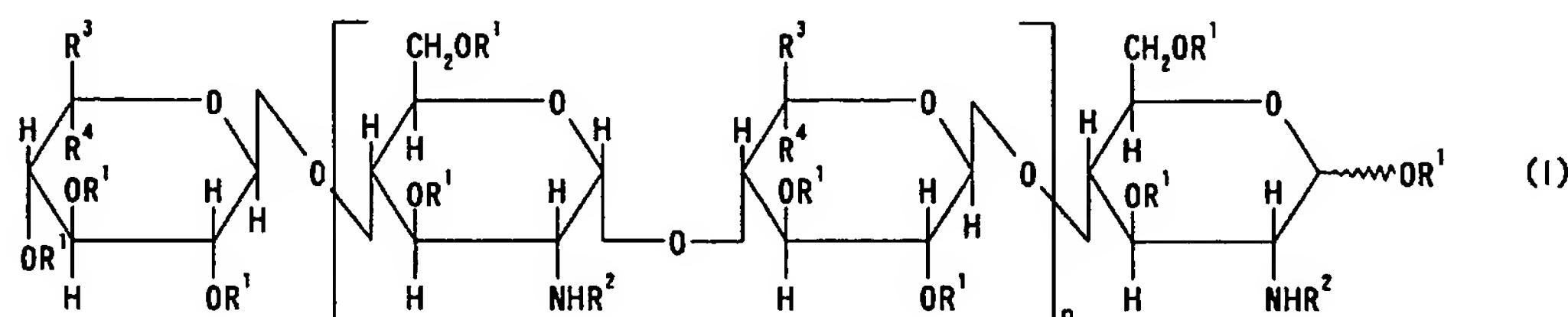
本発明においてオリゴ糖を構成するウロン酸残基とグルコサミン残基の2糖の繰り返し構造は、糖が多いとHGF産生活性は高くなる。一方、糖が少ないと抗血液凝固作用及びLPL放出活性が低下するという特徴を有する。このため、本発明においてオリゴ糖は、HGF産生促進活性を有しつつ、抗血液凝固作用及びLPL放出活性という副作用の低減された2乃至16糖が好ましく、2乃至8糖がより好ましく、6乃至8糖がとりわけ好ましい。

【0015】

本発明のHGF産生促進薬剤に使用されるオリゴ糖としては、例えは以下で表される化合物及びそれらの塩が例示される。

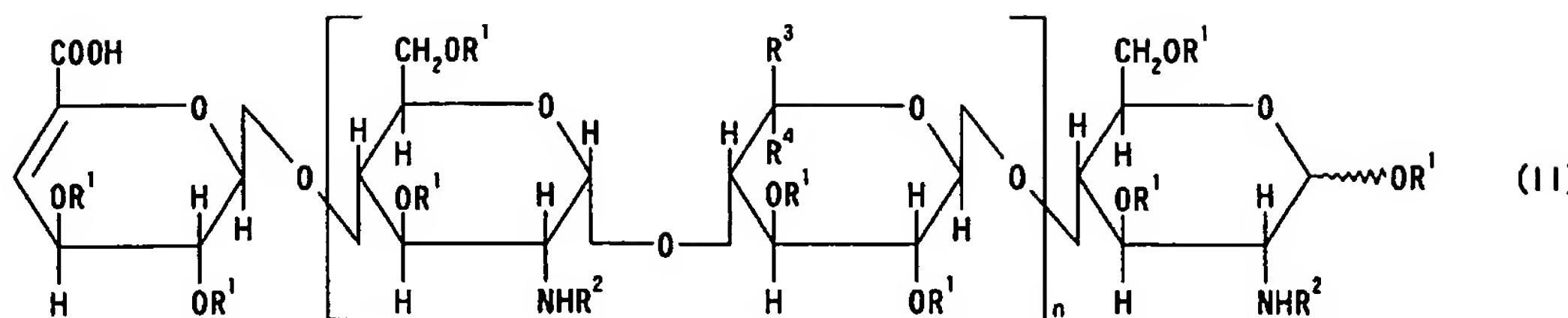
(a) 式(I)

【化9】



(式中、R¹は、水素、硫酸基、アルキル、アシル又は置換基を有していてもよいアミノを示し、R²は、水素、硫酸基、アルキル又はアシルを示し、R³及びR⁴は異なって、水素又はカルボキシルを示し、nは0～7を示す。)

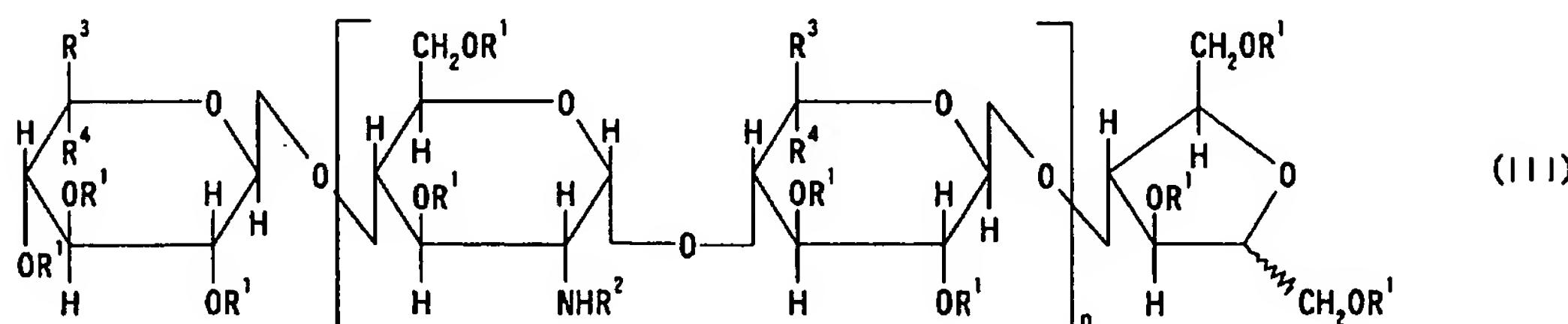
(b) 式(III)



(式中、各記号は上記と同じである。)

(c) 式 (III)

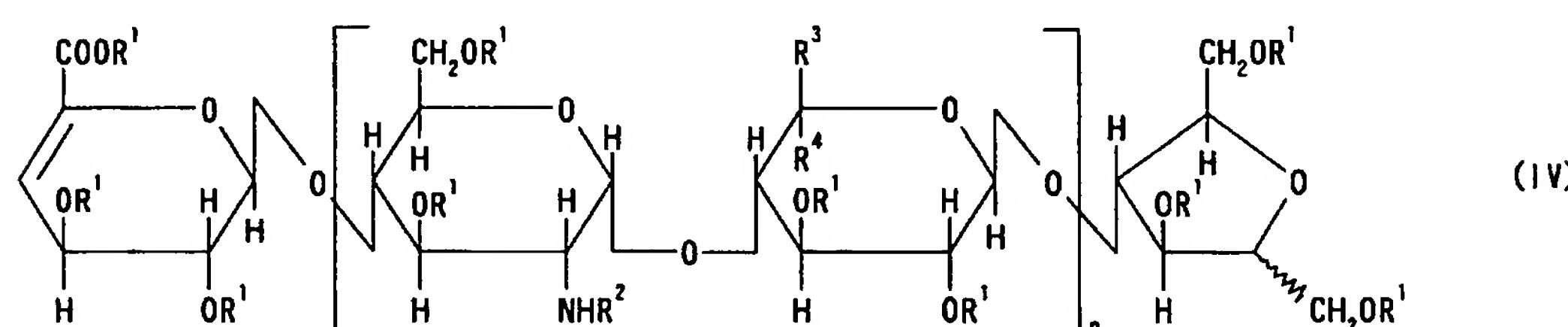
【化11】



(式中、各記号は上記と同じである。)

(d) 式 (IV)

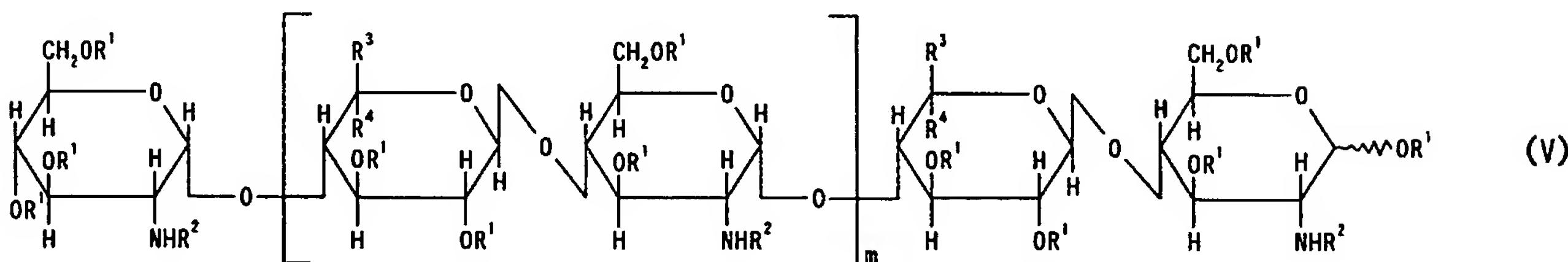
【化12】



(式中、各記号は上記と同じである。)

(e) 式 (V)

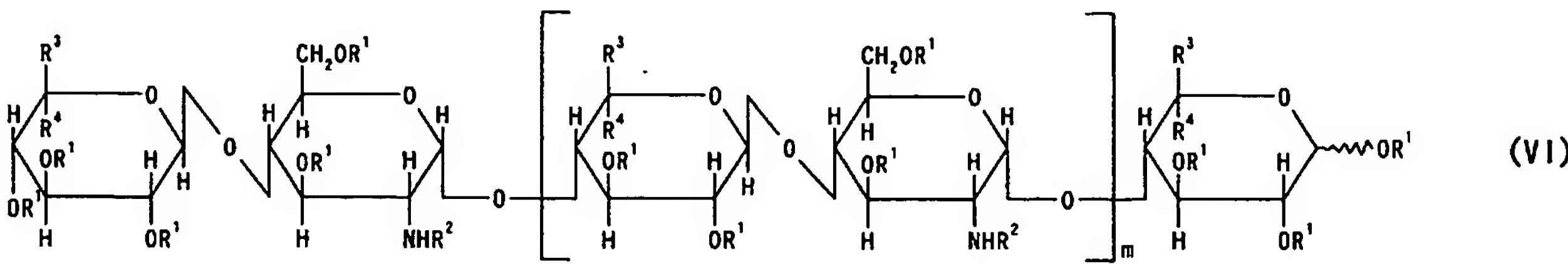
【化13】



(式中、mは0～6を示し、R¹、R²、R³及びR⁴は上記と同じである。)

(f) 式 (VI)

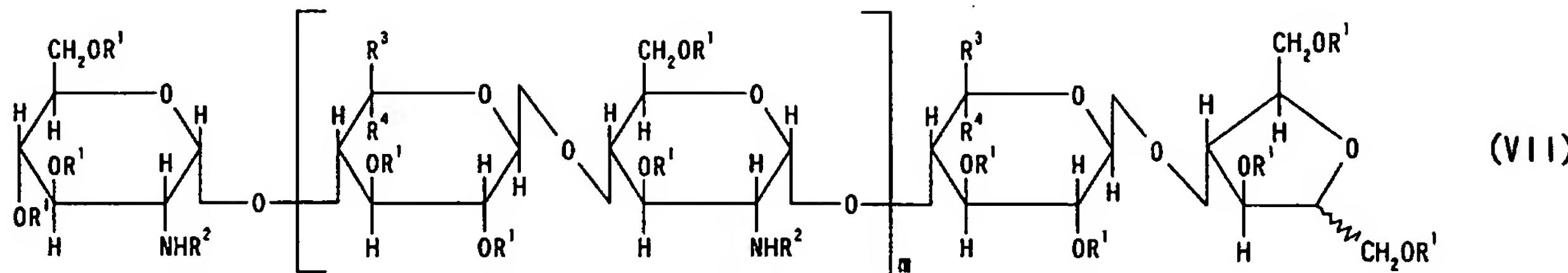
【化14】



・(vii)、(viii)はv～vを示し、(v)、(vi)、(vii)～(viii)は上記と同じである。)

(g) 式(VII)

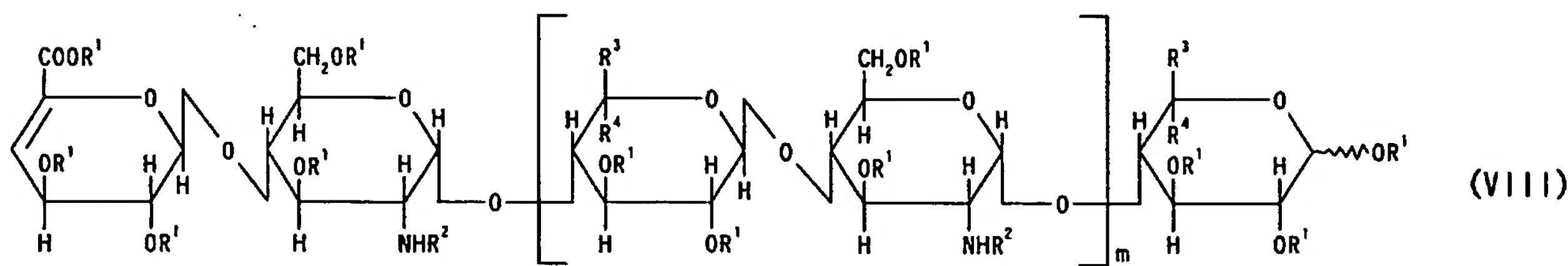
【化15】



(式中、mは0～6を示し、R¹、R²、R³及びR⁴は上記と同じである。)

(h) 式(VIII)

【化16】



(式中、mは0～6を示し、R¹、R²、R³及びR⁴は上記と同じである。)

【0016】

上記式(I)～(VIII)で示されるR¹及びR²で示されるアルキルとしては、炭素数1～6の低級アルキルが好ましく、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル等が挙げられる。R¹及びR²で示されるアシルとしては、式-(C=O)-R³、-(C=O)-OR³、-(C=O)-NR³R⁴、-(C=S)-NHR³、-SO-R⁵、-SO₂-R⁵又は-SO₂-NHR³（式中、R³及びR⁴は水素原子、炭化水素基、R⁴は水素原子、炭素数1～6の低級アルキル、R⁵は置換基を有していてもよい炭化水素基を示す）で表されるアシル等が挙げられる。アシルの中でも、-(C=O)-R³が好ましく、アセチルがとりわけ好ましい。前記式中、R³及びR⁵で示される炭化水素基としては、例えば、鎖状炭化水素基（例、アルキル、アルケニル、アルキニル等）などが挙げられる。アルキルとしては炭素数1～6の低級アルキル（例、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル等）などが好ましい。アルケニルとしては、例えばC₂～6アルケニル（例、ビニル、アリル、イソプロペニル、1-ブテニル、2-ブテニル、3-ブテニル、2-メチル-2-プロペニル、1-メチル-2-プロペニル、2-メチル-1-プロペニル等）などが好ましい。アルキニルとしては、例えばC₂～6アルキニル（例、エチニル、プロパルギル、1-ブチニル、2-ブチニル、3-ブチニル、1-ヘキシニル等）などが好ましい。

【0017】

上記式(I)～(VIII)で示されるR²で示されるアミノ基に、置換してもよい置換基としては、硫酸基、アルキル、アシルが挙げられるが、硫酸基又はアシルが好ましい。アシルは、-(C=O)-R⁵がより好ましく、とりわけアセチルが好ましい。該アルキル及びアシルは上述のR¹及びR²のアルキル及びアシルと同義である。

R¹とR²の好ましい組み合わせとしては、R¹が水素又は硫酸基であり、R²が水素、硫酸基又はアシルが好ましい。この場合、アシルは-(C=O)-R³が好ましく、とりわけアセチルが好ましい。

nは0～7、好ましくは0～3、とりわけ2～3が好ましい。mは0～6、好ましくは0～2、とりわけ2が好ましい。

上記オリゴ糖、例えば上記式(I)～(VIII)で示される化合物の塩としては、例えはリチウム、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属塩、例えはカルシウム等のアルカリ土類金属塩、例えは無機酸塩(例えは、塩酸塩、硫酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩等)、有機酸塩(例えは、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、プロピオン酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、乳酸塩、シュウ酸塩、メタンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩等)等の酸付加塩等が挙げられる。

【0019】

本発明のHGF産生促進薬剤に使用されるオリゴ糖又はその塩は、通常ヘパリン又はヘパラン硫酸から製造される。ヘパリンは、高分子ヘパリンでも低分子ヘパリンでもよく、ヘパラン硫酸は、高分子ヘパラン硫酸でも低分子ヘパラン硫酸でもよい。本発明で使用されるオリゴ糖又はその塩は、高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸を断片化して得られる。原料となる高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸は、生体材料から抽出して得られるものであってもよく、化学合成によって製造されたヘパリン又はヘパラン硫酸及びそれらの類似物質であってもよい。

【0020】

原料となる高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸を生体材料から抽出して得る場合は、ヒト組織を含む種々の哺乳動物組織(例えは、脾臓、肺臓、筋肉等)から得ることができるが、一般にはブタやヒツジの腸粘膜又はウシの肺起源のものが用いられる。好ましいヘパリン供給源は、ブタの腸粘膜である。一般にヘパリンは、材料となる組織を自己分解させ、該組織をアルカリで抽出し、次いで蛋白を凝固させ、次いで酸化により上清からヘパリン-蛋白コンプレックスを沈殿させることによって選択した組織供給源から製造される。該コンプレックスはエタノールやアセトンもしくはその混合物のような極性非水性溶媒を用いて再沈殿させることによって回収され、エタノールのような有機溶媒で抽出して脂肪を除去し、例えはトリプシンのような蛋白分解酵素で処理して蛋白を除去する。ヘパリンを調製する方法は、例えは第14改正日本薬局方解説書、Charles, A. F. らの論文(Biochem. J. 1936年, 第30巻, p. 1927-1933)に記載されており、Chemistry and Biology of Heparin(1981年)(Lundblad, R. L. ら編、Elsevier Publishers, North Holland, New York)中に開示されているような基本的方法を改良したものが知られている。一般には、ヘパリンを抗血液凝固剤として製造するための通常の方法で組織から得ることができる(非特許文献7)。

【0021】

上記のように、生体材料から抽出して得られる高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸は、ウロン酸(IdoA又はGlcA)とグルコサミンからなる二糖を構成単位として、該二糖の繰り返しからなる多糖である。GlcAとIdoAはヘパリン及びヘパラン硫酸のいずれにも存在する。ヘパリンでは、ウロン酸としてIdoAが多く含まれ、ヘパラン硫酸ではGlcAが多い。GlcAとIdoAが混在するのは、一部のGlcA残基の5炭素がエピマー化し、IdoAに変換されるためである。ヘパラン硫酸がよりヘパリン様になるにつれてIdoA/GlcA比は上昇する。

【0022】

また、原料となる高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸は化学的に合成されたヘパリン又はヘパラン硫酸類似物質でもよく、この場合は上記のような天然の組成ではないことがあるが、一般にヘパリン又はヘパラン硫酸類似物質と称されるものは本発明のHGF産生促進薬剤に使用されるオリゴ糖又はその塩の原料として用いることができる。

また、本発明では、分子量が3000-6000の低分子ヘパリン又は低分子ヘパラン硫酸を原料とすることもできる。分子量が3000-6000の低分子ヘパリンは、第Xa因子抑制作用が強い一方、抗トロンビン作用は弱く、出血リスクの少ない低分子ヘパリンとして臨床に応用されている。分子量が3000-6000の低分子ヘパリンは、血小板凝集作用は弱く、またLPL等を血管壁から遊離させる作用も弱く、皮下注射での吸収

セイドウカンパニーが販売している。本発明のHGF産生促進薬剤に使用されるオリゴ糖又はその塩は、分子量が3000-6000の低分子のヘパリン又は低分子ヘパラン硫酸よりもさらに低分子でもよく、従来一般に低分子ヘパリン又は低分子ヘパラン硫酸と呼ばれているものであっても、本発明のHGF産生促進薬剤に使用されるオリゴ糖又はその塩の原料とすることができます。

【0023】

高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸あるいは分子量が3000-6000の低分子ヘパリンを断片化する方法としては、酵素的にグリコシド結合を分解するか又は化学的に分解する方法が挙げられる。酵素的に分解する場合は、ヘパリナーゼ又はヘパリチナーゼ等の酵素が用いられ、例えばヘパリチナーゼI、ヘパリチナーゼII、及びヘパリナーゼ等のヘパリン骨格を低分子化するヘパリン分解酵素を用いて高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸を分解する方法で調製することができます。通常は、消化前の高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸100mgに対して約0.02~2.0U、好ましくは約0.1~1.0Uの酵素を用いて約20~45°C、好ましくは約30~40°Cで3時間以上、好ましくは6時間以上、より好ましくは約8~12時間反応させることで調製することができますが、上記条件に限定はされず条件は適宜選択することが可能である。化学的に分解する場合は、例えば亜硝酸分解法、過酸化水素分解法、β脱離法等の公知の方法が用いられる(非特許文献7)。

【0024】

断片化された高分子ヘパリン又は高分子ヘパラン硫酸の混合物から、本発明で使用されるオリゴ糖又はその塩を取得、精製するためには、ゲルfiltrationクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等を単独又は組み合わせ行うことができる。例えばゲルfiltrationクロマトグラフィーに、例えばアマシャムバイオサイエンス社製のSuperdex 30 pgカラム(カラム1.6cm×60cm、流速0.4ml/分)を用いる場合には、16糖画分は約135~138分、14糖画分は約140~144分、12糖画分は約146~151分、10糖画分は約154~161分、8糖画分は約163~172分、6糖画分は約175~188分、4糖画分は約190~209分、2糖画分は約216~249分で溶出されうる。例えば上記の分画によって得られたオリゴ糖をイオン交換クロマトグラフィー等によりさらに分離することで均一構造の物質からなる画分を得ることが可能である。イオン交換クロマトグラフィーを用いる場合は、溶液中の塩濃度が高くなることが多いため、得られた画分を常法により脱塩することが好ましい。

なお、精製のプロセス中にアンチトロンビンIIIを固定化したカラム等の工程を組み込むと、該カラムに非吸着の画分を回収することにより、Xa因子抑制活性の除去されたオリゴ糖を得ることができ、完全に抗血液凝固活性物質であるオリゴ糖を除去することができるのにより好ましい。アンチトロンビンIII非吸着のオリゴ糖であってもHGF産生促進は保持されているため、本発明に適用できる。

また、上記方法により、得られたオリゴ糖を自体公知の方法に従い、硫酸化、アルキル化、アシル化又はアミノ化することもできる。

【0025】

本発明のHGF産生促進薬剤に使用されるオリゴ糖又はその塩は、化学合成によって人工的に合成してもよい。例えば、IdoA又はGlcAあるいはそれらの誘導体と、グルコサミンあるいはその誘導体等から単位2糖を合成し、これを重合させて合成することができる(Karst, N. A. and Linhardt, R. J., Curr. Med. Chem., 2003年, 第10巻, p. 1993-2031, Lee, J. C., J. Am. Chem. Soc., 2004年, 第126巻, p. 476-7)。あるいは、酵素反応を組み合わせたchemoenzymaticな合成を行ってもよい(Kubera, B. et al., J. Biol. Chem., 2003年, 第278巻, p. 52613-21)。

【0026】

本発明のHGF産生促進薬剤によるHGF産生促進活性の測定は、上記オリゴ糖又はそ

・の塩で自己産生細胞に添加し培養した場合、上記タツ一組入はての塩を加へないで培養した培養液中のHGF濃度をELISA法で測定し、それらの値を比較することで判定できる。HGF産生細胞としては、ヒト胎児肺線維芽細胞であるMRC-5やMRC-9等の細胞株を用いることができる。

【0027】

本発明のHGF産生促進薬剤に使用されるオリゴ糖又はその塩における抗血液凝固作用は、従来の低分子ヘパリンの抗血液凝固活性を測定するために実施されている方法に従って、活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）あるいは抗Xa活性を測定することで評価できる。

本発明のHGF産生促進薬剤に使用されるオリゴ糖又はその塩におけるLPL放出活性は上記オリゴ糖又はその塩をマウス又はラット等に投与して一定時間後に血漿を採取し、該血漿中のLPL量を測定することで評価できる。血漿中のLPL量の測定は、LPL活性を測定するか、又はELISAによってLPLタンパク質量として測定することができる。

【0028】

本発明のHGF産生促進薬剤は、HGFの産生を促進することから、HGFの薬理作用を介して各種疾患の予防・治療に有効である。本発明のHGF産生促進薬剤は、例えは、肝疾患治療剤、腎疾患治療剤、創傷治療剤、皮膚潰瘍治療剤、毛根細胞増殖剤、制ガン剤、肺傷害治療剤、ガン療法用副作用防止剤等の用途を有し、より具体的には、例えは、肝疾患（例えは、肝炎、肝硬変、肝不全、外科手術後の肝再生等）、腎疾患（例えは、糸球体腎炎、腎不全、腎性貧血症、糖尿病性腎症、薬剤投与後の腎傷害等）、皮膚疾患（例えは、白斑病、熱傷、床擦れ、皮膚潰瘍、禿頭症等）、血液疾患（例えは、血小板減少症、骨髄移植等）、眼疾患（例えは、角膜潰瘍等）、肺疾患（例えは、肺炎、肺気腫、肺結核、慢性閉塞性肺疾患、塵肺、肺線維症等）、胃十二指腸疾患（例えは、胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍等）、癌疾患及びその関連疾患（例えは、各種癌、癌療法による副作用、例えは肝毒性、腎毒性、恶心、嘔吐、血小板減少、脱毛等の予防等）、骨疾患（例えは、骨粗鬆症、骨異形成症、変形性関節炎等）、中枢疾患（例えは、神経分化異常症等）などの疾患の予防・治療に有用である。

【0029】

本発明のHGF産生促進薬剤は種々の製剤形態（例えは、注射剤、固形剤、カプセル剤等）をとりうるが、上記オリゴ糖又はその塩又は慣用の担体と共に注射剤とされるのが好ましい。当該注射剤は常法により調製することができ、注射剤中の上記オリゴ糖又はその塩の濃度は、0.0001～5W/V%程度の範囲から適宜調整される。注射剤は、例えは、上記のオリゴ糖又はその塩を適切な溶剤（例えは、滅菌水、緩衝液、生理食塩水等）に溶解した後、フィルター等で濾過して滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができる。慣用の担体としては、好ましくは安定化剤が挙げられる。安定化剤としては、例えは、アルブミン、グロブリン、ゼラチン、マンニトール、グルコース、デキストラン、エチレングリコール等が挙げられる。さらに、製剤化に必要な医薬上許容される添加剤、例えは等張化剤（塩化ナトリウム、塩化カリウム、クリセリン、マンニトール、ソルビトール、ホウ酸、ホウ砂、ブドウ糖、プロピレングリコール等）、緩衝剤（リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液、クエン酸緩衝液、トリス緩衝液、グルタミン酸緩衝液、イブシロンアミノカプロン酸緩衝液等）、保存剤（バラオキシ安息香酸メチル、バラオキシ安息香酸エチル、バラオキシ安息香酸プロピル、バラオキシ安息香酸ブチル、クロロブタノール、ベンジルアルコール、塩化ベンザルコニウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、ホウ酸、ホウ砂等）、増粘剤（ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール等）、安定化剤（亜硫酸水素ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、アスコルビン酸、ジブチルヒドロキシトルエン等）、pH調整剤（塩酸、水酸化ナトリウム、リン酸、酢酸等）などを適宜添加した溶液に、上記オリゴ糖又はその塩を溶解した後、フィルター等で濾過して滅菌し、次いで無菌的な容器に

ル均するこによく調製するこができる。また適当な溶媒添加剤、例えばノルマル（エタノール等）、ポリアルコール（プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）、非イオン界面活性剤（ポリソルベート80、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油50等）などを使用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプル又はバイアルに充填される。なお、注射剤等の液状製剤は、凍結保存又は凍結乾燥等により水分を除去して保存するのが望ましい。凍結乾燥製剤は、用時に注射用蒸留水等を加え、再溶解して使用される。

【0030】

また、本発明のHGF産生促進薬剤は、外用剤、例えば軟膏状、ゲル状、液状等に製剤化される。外用剤は、例えば軟膏基剤（吸水軟膏、浸水軟膏、マクロゴール、精製ラノリン等）にオリゴ糖又はその塩を練合して調製される。また、硬化剤（セタノール、ステアリルアルコール等）や、ゲル状とする場合には、増粘剤（カルメロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポビドン等）などを使用することができる。外用剤中の有効成分含量は、外用薬の適用疾患、適用部位等に応じて0.0001～5W/W%程度の範囲から適宜調整することができる。

本発明のHGF産生促進薬剤は、該製剤の形態に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、注射剤の形態にして静脈、動脈、皮下、筋肉内等に投与することができる。その投与量は、患者の症状、年齢、体重等により適宜調整される。その投与量は、患者の症状、年齢、体重等により適宜調整されるが、通常0.001mg～500mg、好ましくは0.01mg～100mgであり、これを1日1回ないし数回に分けて投与するのが適当である。

【0031】

本発明のHGF産生促進薬剤は、上記オリゴ糖又はその塩とHGFの混合製剤であってもよい。HGFをヘパリン又はヘパラン硫酸との複合体として生体に投与すると、HGFの血中半減期が延長されることが知られている（Kato, Y. et al., Hepatology, 1994年, 第20巻, p. 417-424）ことから、上記オリゴ糖又はその塩とHGFを混合製剤とすることにより、製剤中に含まれるHGFの血中半減期が延長される。この場合、オリゴ糖又はその塩とHGFの配合比は、HGF1質量に対し、通常0.00002～50000(W/W)、好ましくは0.01～500(W/W)である。この際、製剤中のオリゴ糖又はその塩は、同時に生体中の内在性HGFの産生を促進するので、HGFの作用を介した疾患治療・予防においてより効果的である。同様の理由から、本発明のHGF産生促進薬剤を生体に投与する際、別の製剤として同時にHGFを投与することも可能である。

以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

なお、実施例で使用する各略号の意味は、次のとおりである。

HGF：肝細胞増殖因子

FCS：牛胎児血清

DMEM培地：ダルベッコ改変イーグル培地

PBS：リン酸緩衝食塩水

ELISA：エンザイムーリンクド・イムノソルベント・アッセイ (enzyme-linked immunosorbent assay)

LPL：リボプロテインリバーゼ

APTT：活性化部分トロンボプラスチン時間

US：ウロン酸残基

Glc：グルコサミン残基

Ac：アセチル

【実施例1】

【0032】

高分子のヘパリンNa（Scientific Protein Laboratory

ヒト、マウス、ラットのヒアルロン酸を用いて、ヒアルロン酸ノトソンム液（ヒアルロン酸ナトリウムを含む）（pH 7.0）2 mL に溶解し、ヘパリナーゼ（生化学工業）を 0.5 unit 添加して 37 °C で 10 時間反応させた。反応液を 100 °C で 2 分間加熱して反応を停止させた。反応液上清の 0.3 mL を Superdex 30 pg カラム（Φ 1.6 cm × 60 cm）（アマシャムバイオサイエンス）に供してゲルfiltrationを行った。移動相に 200 mM 重炭酸アンモニウム水溶液を用い、0.4 mL/min の流速で通液した。溶出液の 230 nm における吸光度をモニターし、フラクションを分画した。溶出されたヘパリン断片を分子サイズごとに回収した。ヘパリン断片は 2 糖、4 糖、6 糖、8 糖、10 糖、12 糖、14 糖、16 糖のオリゴ糖分画として得られた（図 1）。

【実施例 2】

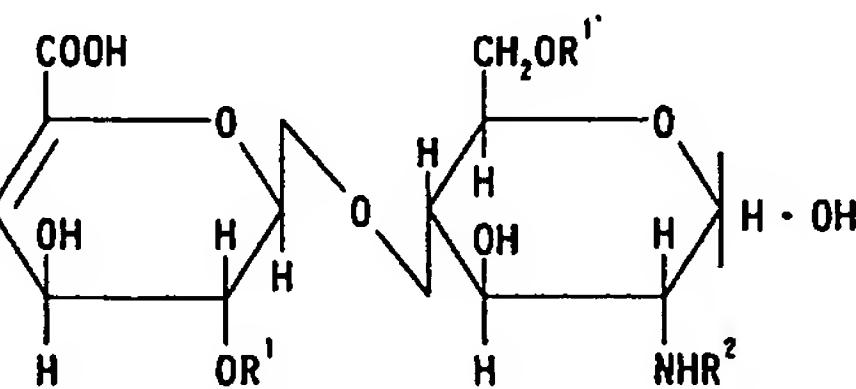
[0 0 3 3]

実施例1で得られたヘパリン断片（オリゴ糖）を用いてHGF産生促進活性を測定した。活性測定のためには、ヒト胎児肺線維芽細胞であるMRC-9細胞を用い、ヘパリン断片（オリゴ糖）添加時の該細胞のHGF産生量を比較した。まず、MRC-9細胞を 5×10^4 個/cm²の密度で48wellプレートに播種し、10%FCSを含むDMEM培地で1日培養した。次に、該細胞の培地を吸引除去し、PBS 0.5mLで2回洗浄した後、培地を1%FCSを含むDMEM培地に交換して培養を継続した。この際、培地中に実施例1で得られたヘパリン断片を1μMとなるように添加した。24時間後に培養上清を回収し、培養上清中に分泌されたHGF量を測定した。HGFの定量はELISA法にて行った。市販の低分子ヘパリン（フラグミン、キッセイ薬品）を添加した場合、HGF産生量は高分子ヘパリンを添加した場合よりわずかに低下していたが、ヘパリン無添加の場合の5倍程度にHGF産生を促進した。実施例1で調製した16糖以下のサイズのヘパリン断片においても、6糖以上のサイズのヘパリン断片においてHGF産生量はヘパリン無添加の場合に比べて上昇していた（図2）。

【実施例 3】

[0 0 3 4]

硫酸基の位置と数の異なる2糖からなるオリゴ糖、monoS(2S)(シグマ社製)、monoS(6S)(生化学工業株式会社製)、diS(2S, NS)(生化学工業株式会社製)、diS(2S, 6S)(シグマ社製)、diS(NS, 6S)(生化学工業株式会社製)及びtriS(2S, NS, 6S)(生化学工業株式会社製)について、HGF産生促進活性を測定した(図3)。実施例2と同様にしてMRC-9細胞を用いてHGF産生促進活性を測定した。この際、上記2糖からなるオリゴ糖の各添加濃度を0~1μMの間で変化させた。硫酸基の配置によってHGF産生促進効果が異なるが、2糖からなるオリゴ糖の添加濃度を選ぶことによって、ほとんどの2糖からなるオリゴ糖においてHGF産生が促進されることが見出された。

記号	略式構造			
		R ¹	R ²	R ^{1'}
monoS(2S)	△UA-2S-GlcN	SO ₃ H	H	H
monoS(6S)	△UA-GlcNAc-6S	H	COCH ₃	SO ₃ H
diS(2S, NS)	△UA-2S-GlcNS	SO ₃ H	SO ₃ H	H
diS(2S, 6S)	△UA-2S-GlcN-6S	SO ₃ H	H	SO ₃ H
diS(NS, 6S)	△UA-GlcNS-6S	H	SO ₃ H	SO ₃ H
triS(2S, NS, 6S)	△UA-2S-GlcNS-6S	SO ₃ H	SO ₃ H	SO ₃ H

【実施例4】

【0035】

実施例1で得られたヘパリン断片（オリゴ糖）について、分子サイズごとに抗血液凝固活性とLPL放出活性を測定した。抗血液凝固活性は活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）を比較することで評価した。APTTの測定には、ウィスターラット（雄）から採取した新鮮血漿を用い、エラジン酸による活性化を利用したデータファイ・APTTキット（システムズ社）を用いた。ラット血漿にヘパリン断片を9 μg/mL又は3 μg/mLとなるように添加し、APTTの値（秒）を比較した。

APTTの測定結果を図4に示す。ヘパリンの代わりに生理食塩水を添加した場合、APTTは約20秒であり、血液は急速に凝固する。血液に未消化の高分子ヘパリンを9 μg/mLの濃度で加えると、APTTが200秒以上に延長され、血液凝固が阻止された。高分子ヘパリンを3 μg/mLの濃度で添加しても、APTTが160秒以上に延長され、血液凝固が大幅に抑制された。市販の低分子ヘパリン（フラグミン、キッセイ薬品）では、高分子ヘパリンよりもAPTTの延長は抑制されたが、APTTの延長は無視できないレベルである。実施例1の16糖ヘパリン断片を9 μg/mLの濃度でえた場合は、APTTは約46秒であり、ヘパリン無添加の場合よりAPTTが延長されたものの、APTTの延長の程度はフラグミンよりも短く、抗凝固活性は大幅に低下した。さらに、分子サイズが低下するほどAPTTが短縮され、4糖以下では9 μg/mL又は3 μg/mLのいずれの添加濃度においても生理食塩水添加の場合のAPTTと同等であった。

LPL放出活性の測定のためには、ウィスターラット（3週齢、雄）の尾静脈からヘパリン断片をラットの体重1gあたり0.3 μg投与し、10分後に腋下静脈巢から採血を行って得られる血漿中のLPL量をELISA（第一化学薬品）によって測定した。LPL放出量の測定結果を図5に示す。高分子ヘパリンでは250ng/mL程度のLPLが放出されたが、低分子ヘパリン（フラグミン、キッセイ薬品）ではLPL放出量が高分子ヘパリンの場合の30%程度に低下していた。また実施例1で調製したヘパリン断片でもLPL放出量が低下しており、分子サイズが低下するほどLPL放出量は低下していた。特に8糖以下ではLPL放出量の低下が顕著であった。

【実施例5】

【0036】

実施例3のヘパリン2糖各種（硫酸基の位置と数が異なる）について、実施例4と同様

・ソノ伝で抗血凝固活性を示す成山活性を測定したところ、図1。ヘパリン-ハリル
2糖においても、抗血液凝固活性とLPL放出活性は検出されなかった。

【産業上の利用可能性】

【0037】

本発明のHGF産生促進薬剤は、出血傾向の副作用を抑制しながらHGFの産生を促進することができ、生体の組織、器官等の傷害の治癒促進に有用である。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】ヘパリン分解産物のゲルfiltrationクロマトグラフィーによる分離を示す図である。

【図2】ヘパリン断片のHGF産生促進活性を示す図である。

【図3】ヘパリン2糖各種のHGF産生促進活性を示す図である。

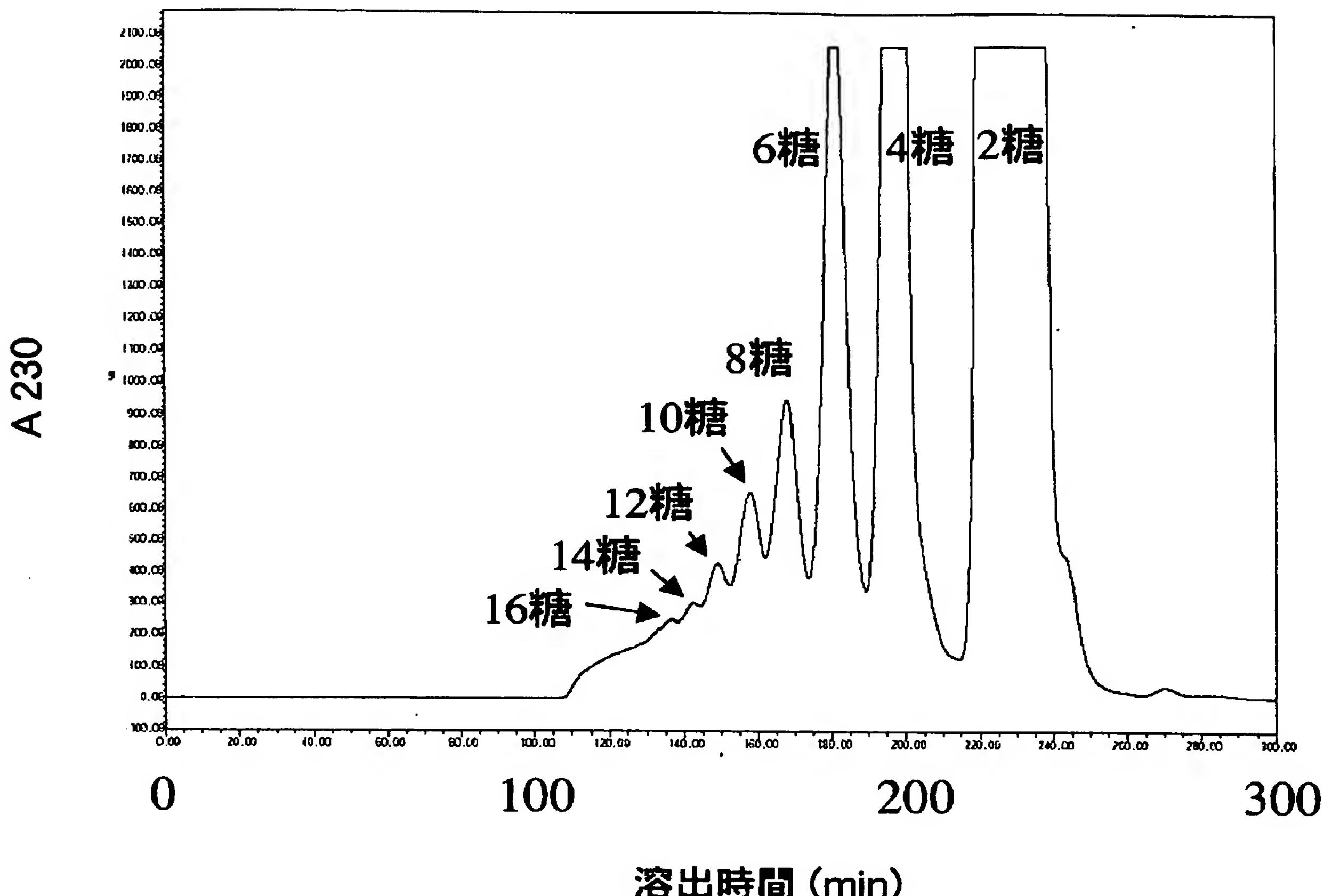
【図4】ヘパリン断片の抗血液凝固活性をAPTTによって評価した結果を示す図である。

【図5】ヘパリン断片のLPL放出活性を示す図である。

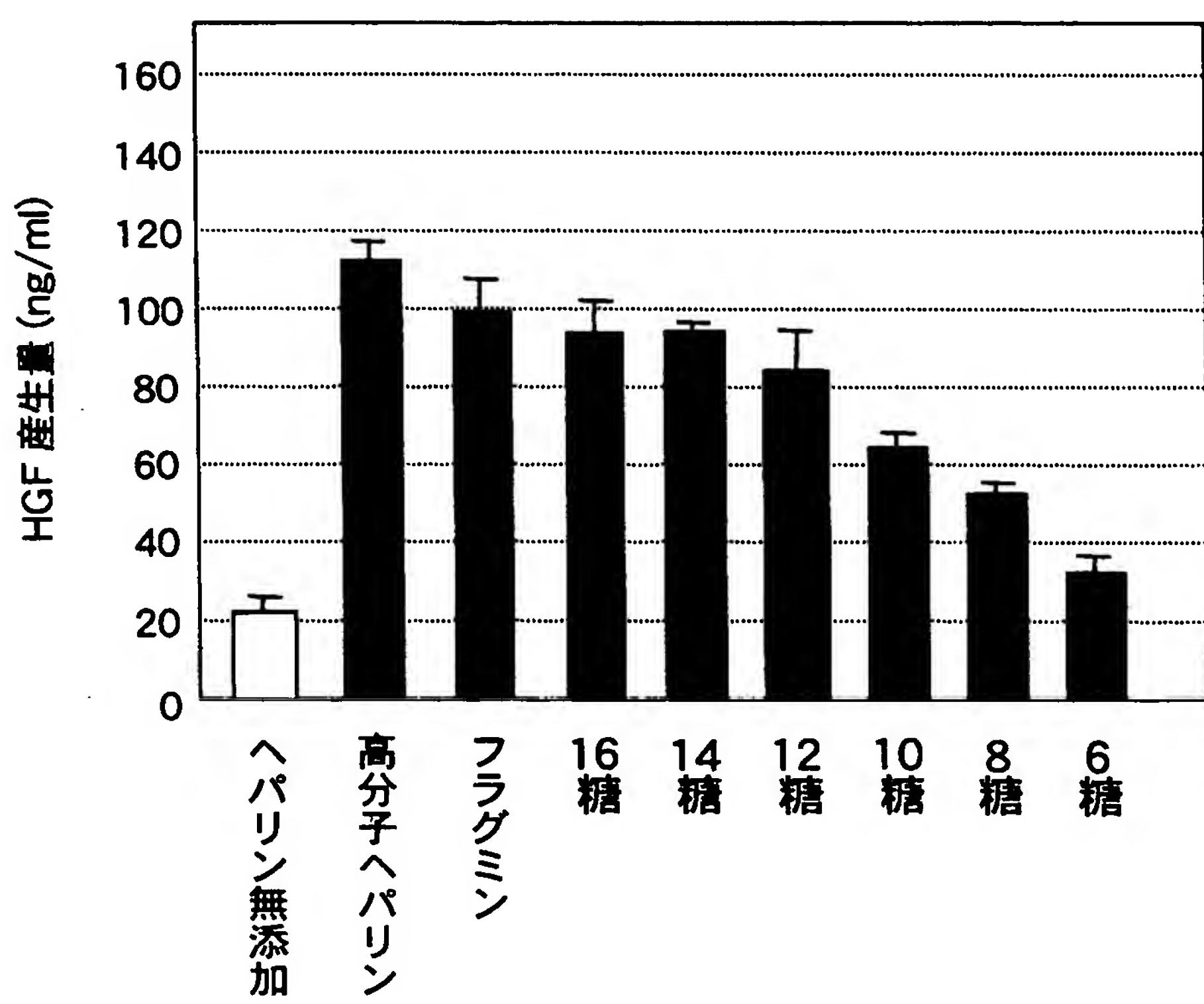
【図6】ヘパリン2糖各種の抗血液凝固活性をAPTTによって評価した結果を示す図である。

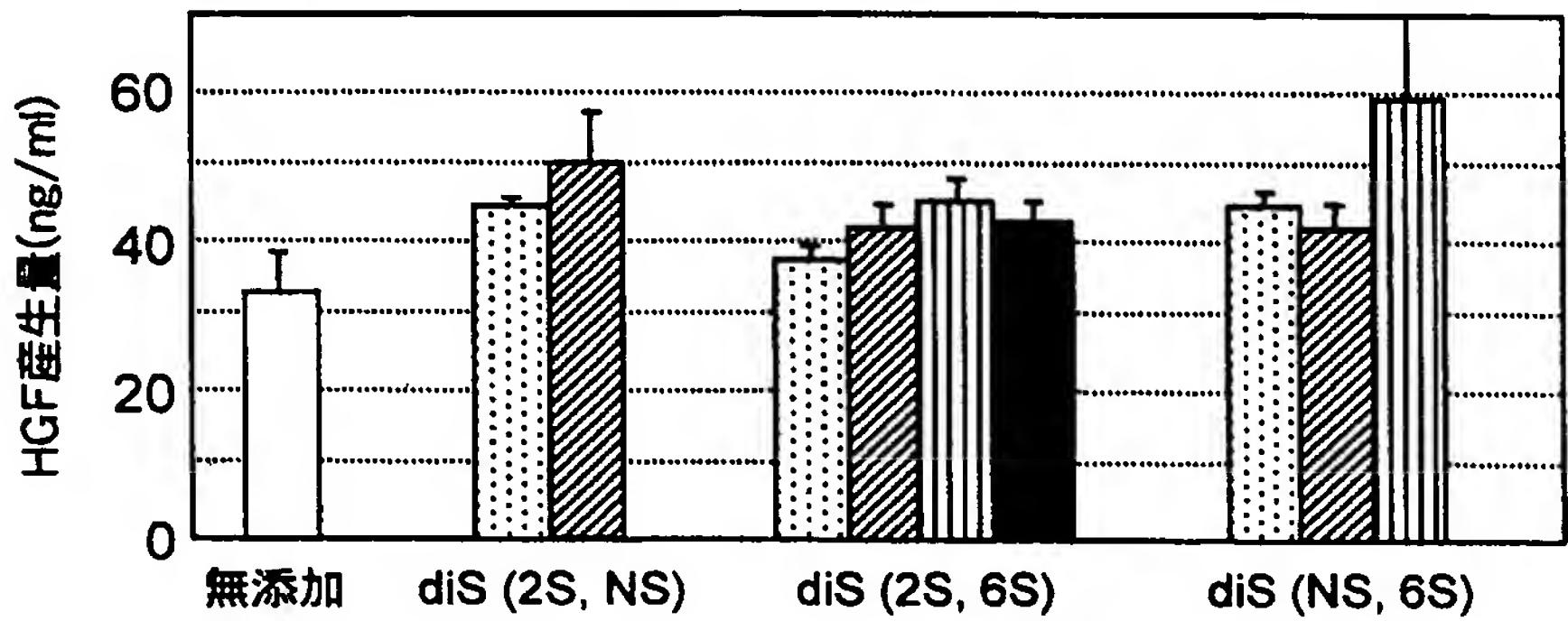
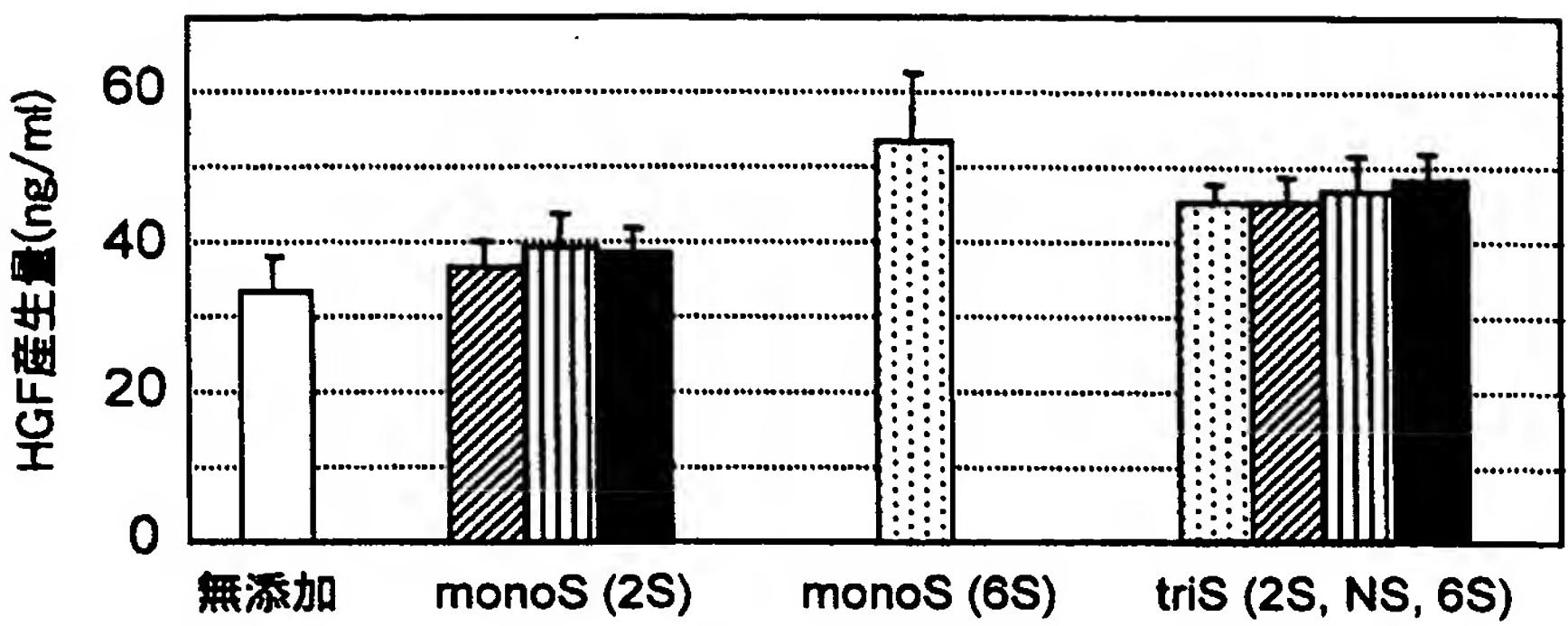
【図7】ヘパリン2糖各種のLPL放出活性を示す図である。

【図 1】



【図 2】



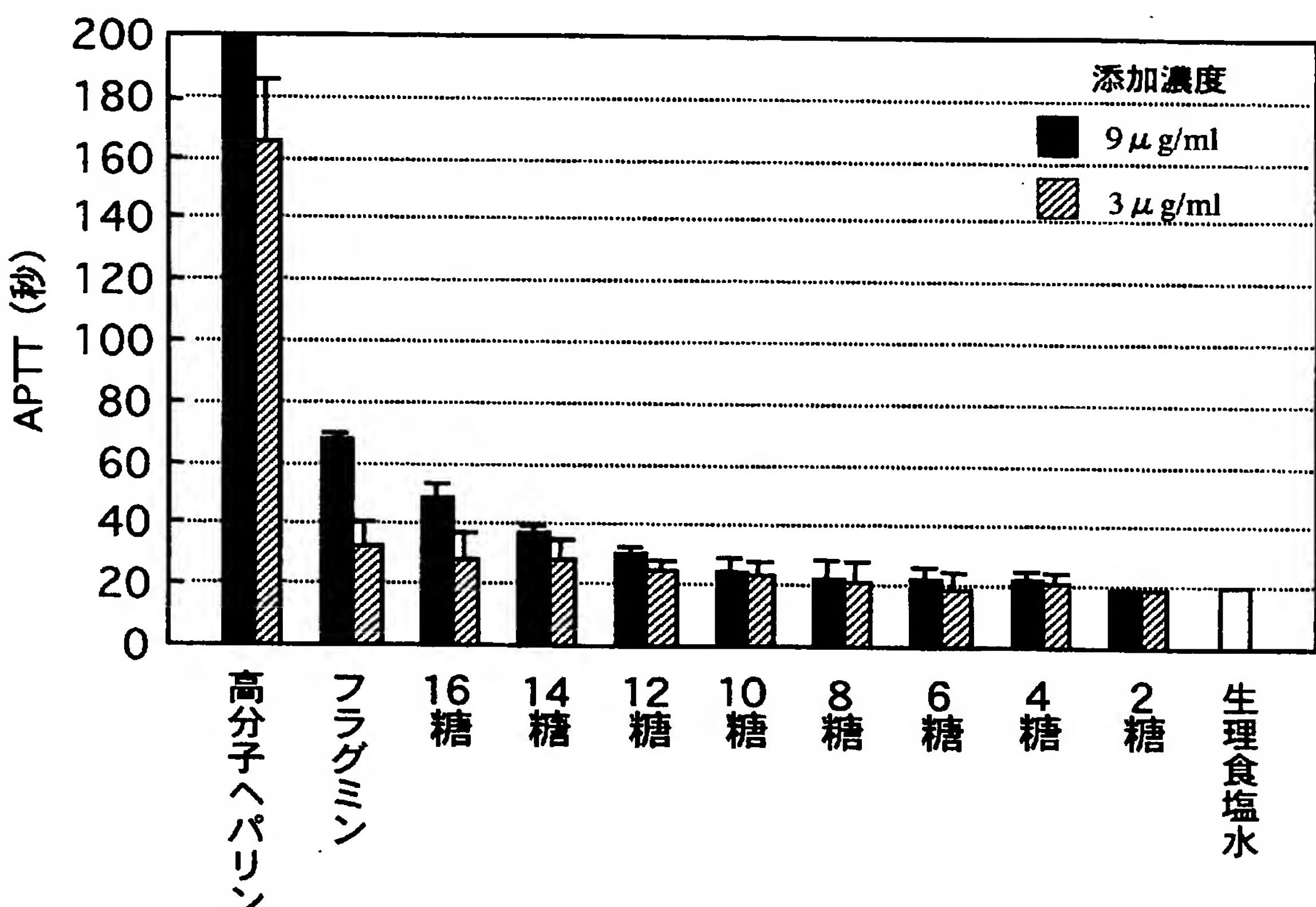


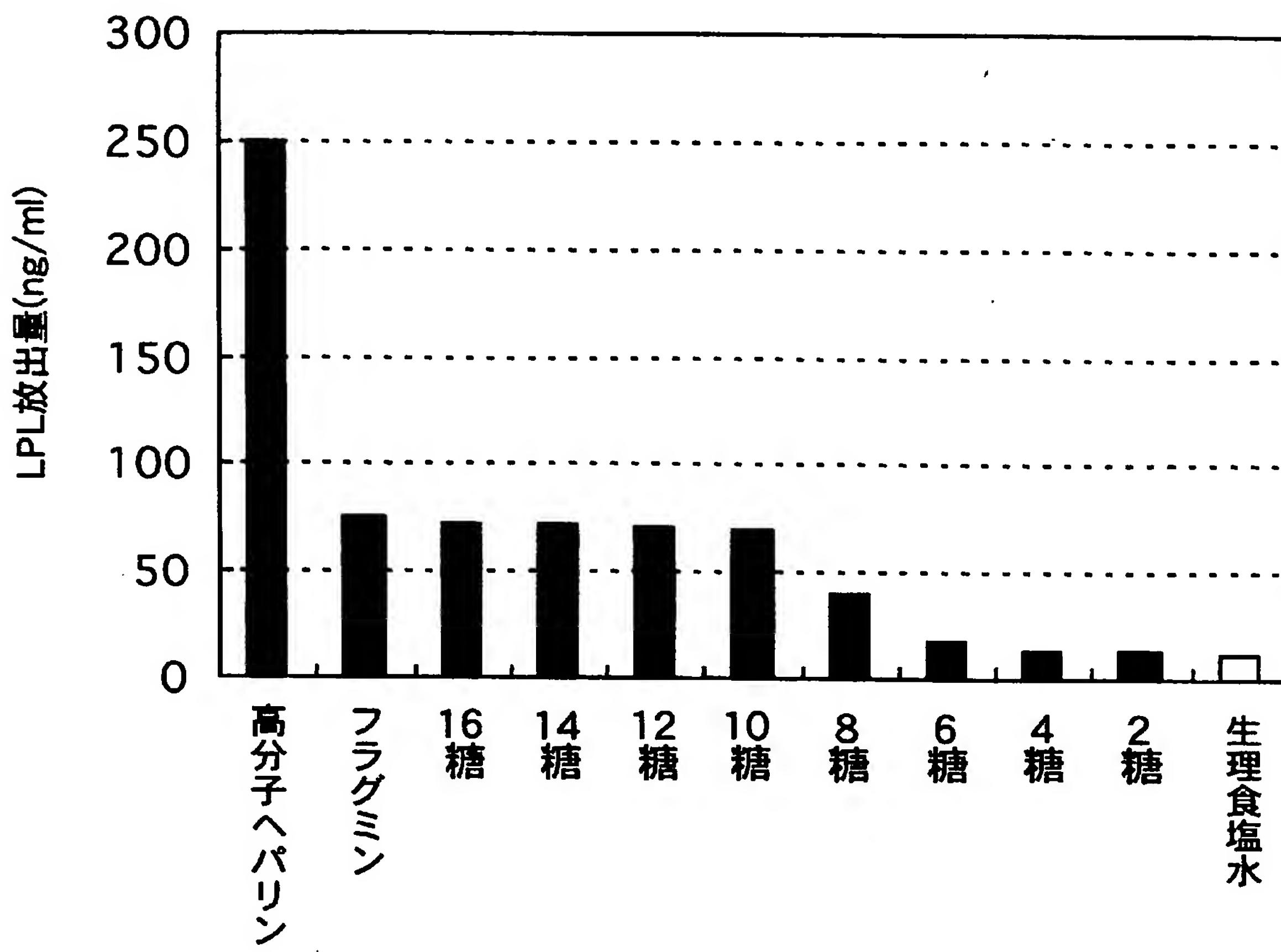
ヘパリン2糖添加濃度

0.001	0.01	0.1	1
□	▨	▨	■

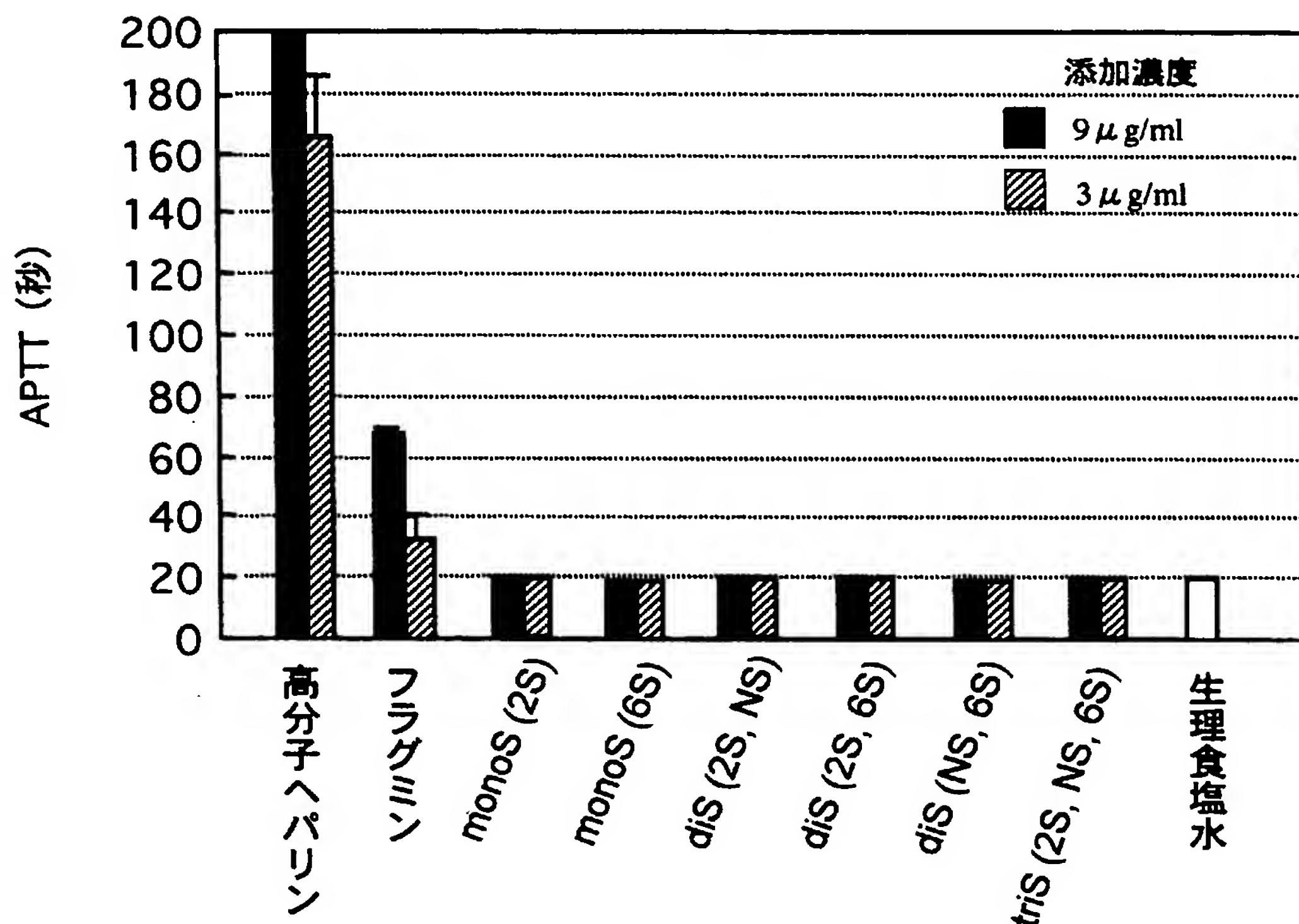
 (μM)

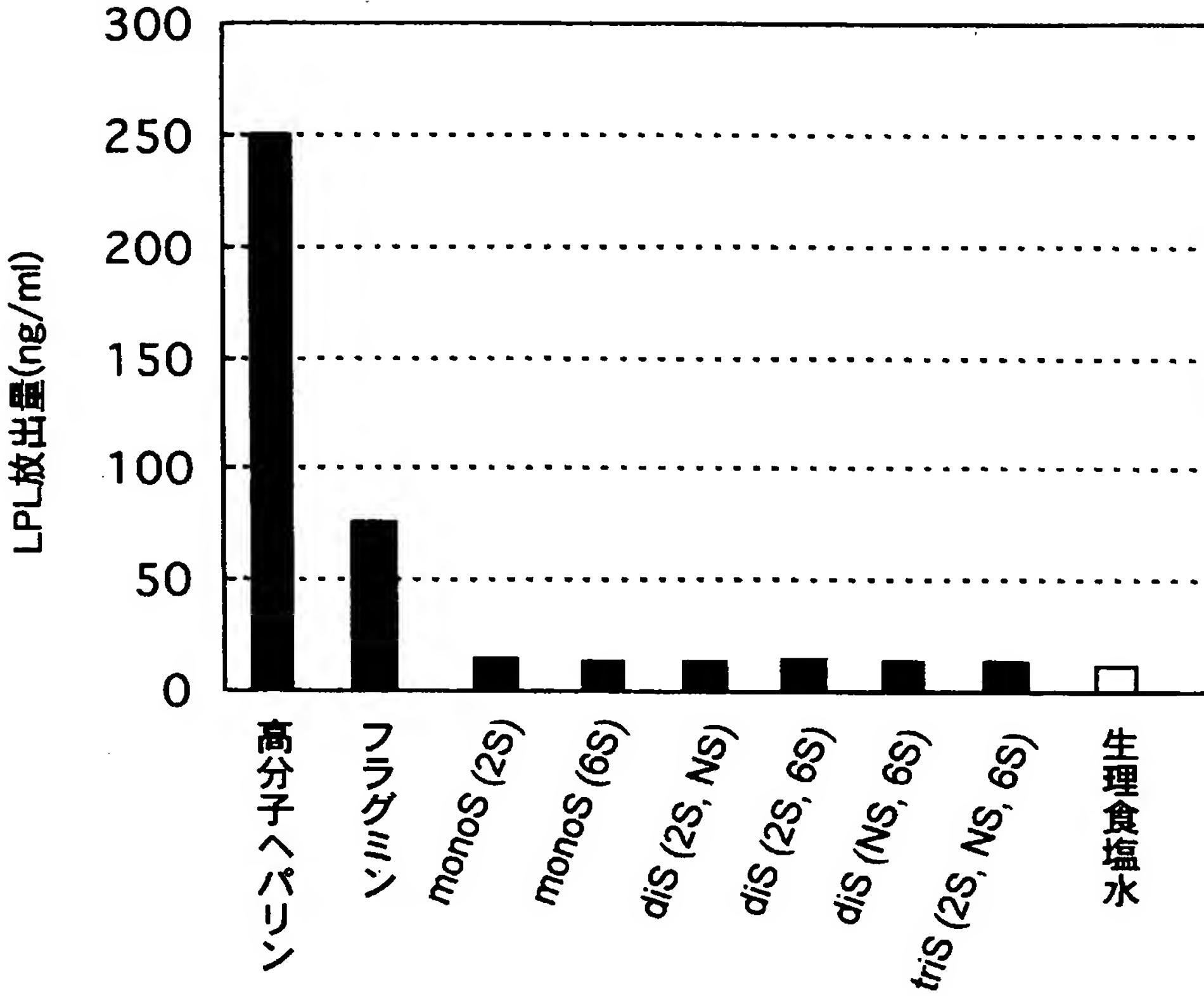
【図4】





【図 6】





【要約】

【課題】 本発明の課題は、ヘパリン様骨格を有し、ヘパリン又はヘパラン硫酸の抗血液凝固作用及びLPL放出活性を有さないか抑制されているオリゴ糖又はその塩を含むHGF産生促進薬剤を提供することである。

【解決手段】 ウロン酸残基とグルコサミン残基からなる2糖の繰り返し構造のヘパリン様骨格を有する2乃至16糖のオリゴ糖であって、

ウロン酸残基及びグルコサミン残基の少なくとも1つのヒドロキシル基が硫酸化、アルキル化、アシル化又はアミノ化されていてもよく、グルコサミン残基の2位のアミノ基が硫酸化、アルキル化又はアシル化されていてもよいオリゴ糖又はその塩を有効成分として含有するHGF産生促進薬剤。

【選択図】 なし

, 5 9 1 1 1 5 0 7 3

20031209

住所変更

京都府京都市左京区岡崎法勝寺町1番地の4

中村 敏一

5 0 2 0 6 8 9 0 8

20030908

住所変更

大阪府大阪市中央区南船場 2-10-27 KAZU ITビル

605号室

クリングルファーマ株式会社

BEST AVAILABLE COPY

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005741

International filing date: 28 March 2005 (28.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-097047
Filing date: 29 March 2004 (29.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 20 May 2005 (20.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse